

**Zell- und molekularbiologische Studien zur zellautonomen
anti-chlamydialen Abwehr dendritischer Zellen und
natürlicher Killerzellen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Nadine Radomski

geboren am 13.05.1987

in Heppenheim

Greifswald, 18.05. 2018

Dekan: Prof. Dr. Werner Weitschies

1. Gutachter: PD Dr. Michael R. Knittler

2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Rödel

Tag der Promotion: 16.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	8
1.1 Chlamydien.....	8
1.1.1 Taxonomie und Krankheitsbilder	8
1.1.2 Intrazelluläre Replikation und Persistenz	11
1.1.3 Wirts-Pathogen Interaktionen.....	13
1.2 Aufbau des Immunsystems	15
1.2.1 Angeborenes Immunsystem.....	16
1.2.2 Adaptives Immunsystem	17
1.2.3 Funktion dendritischer Zellen im Immunsystem.....	19
1.2.4 Mechanismen der MHCII-Antigenpräsentation	20
1.2.5 Exosomen und ihre immunologischen Aufgaben.....	23
1.2.6 Funktion von NK Zellen im Immunsystem.....	25
1.2.7 Immunbiologie einer Chlamydieninfektion.....	26
1.3 Autophagie	28
1.3.1 Funktion und Induktion der Autophagie	28
1.3.2 Xenophagie – Komponenten und Mechanismen	31
1.3.3 Xenophagie im Immunsystem	32
1.4 Zielsetzung der Arbeit	34
2 Material	36
2.1 Biologisches Material	36
2.1.1 Bakterienstämme	36
2.1.2 Zelllinien	36
2.2 Chemikalien und Reagenzien	36
2.3 Medien und Medienzusätze	38
2.4 Antikörper	38
2.4.1 Primärantikörper	38
2.4.2 Sekundärantikörper.....	39
2.5 Inhibitoren.....	40
2.6 Primersequenzen.....	40

Inhaltsverzeichnis

2.7	siRNA-Sequenzen	41
2.8	Kits	41
2.9	Glaswaren.....	42
2.10	Plastikwaren	42
2.11	Verbrauchsmaterial	42
2.12	Geräte.....	43
2.13	Wissenschaftliche Software	44
3	Methoden.....	45
3.1	Zellkulturmethoden.....	45
3.1.1	Kultivierung von Zellen	45
3.1.2	Auftauen von Zellen	45
3.1.3	Passagieren der Zellen.....	46
3.1.4	Kryokonservierung von Zellen	47
3.1.5	Kontrolle der Zellen auf Mykoplasmenkontamination	47
3.2	Arbeiten mit Chlamydien	48
3.2.1	Herstellung eines Chlamydienstocks.....	48
3.2.2	Titerbestimmung eines Chlamydienstocks.....	49
3.2.3	Infektion von Zellen	49
3.2.4	Reinfektionsassay	50
3.3	Zellbiologische Methoden	51
3.3.1	Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit nicht-infektiösen Chlamydien aus NK-Zellen 51	
3.3.2	NK-Zell-Isolierung aus Milzen nicht-infizierter Mäuse	51
3.3.3	Immunfluoreszenzmikroskopie	52
3.3.4	Transmissionselektronenmikroskopie.....	53
3.3.5	Durchflusszytometrie	54
3.3.6	Messung der Autophagie	56
3.3.7	Messung der gebildeten Aggresomen.....	57
3.3.8	Messung des oxidativen Stresses	57
3.3.9	Untersuchung des mitochondrialen Membranpotenzials	58
3.3.10	Messung der Apoptose.....	58
3.3.11	Killing-Assay	59
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	59
3.4.1	Herstellen von Zelllysaten	59
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60

Inhaltsverzeichnis

3.4.3	Western-Blot-Analyse.....	61
3.4.4	Isolation von Exosomen.....	62
3.4.5	Isolation von Aggresomen.....	63
3.4.6	Metabolische Markierung von JAWSII-Zellen	64
3.4.7	Identifizierung von Proteinen mittels nLC-MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie.....	64
3.4.8	L-Lactatassay	66
3.4.9	Messung der ATP-Konzentration in Zellen	67
3.4.10	IFN- γ -ELISA.....	67
3.4.11	Nachweis von Granzym-B.....	68
3.5	Molekularbiologische Methoden	68
3.5.1	RNA-Isolation.....	68
3.5.2	Reverse Transkription.....	69
3.5.3	Semiquantitative PCR	69
3.5.4	siRNA-vermittelter <i>Knockdown</i>	70
3.6	Funktionaler Antigenpräsentations-Assay	71
3.6.1	EB-Immunisierung von C57BL/6 Mäusen	71
3.6.2	Isolation von CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz	72
3.6.3	Co-Kultivierung dendritischer Zellen mit CD8 ⁺ T-Zellen	72
3.7	Statistische Analyse	73
4	Ergebnisse.....	74
4.1	Mito-Xenophagosomaler Abbau chlamydialer Strukturen in DCs	74
4.1.1	Rolle von cPLA2 beim autophagosomalen Abbau chlamydialer Strukturen in DCs.....	75
4.1.2	Wirkung von Arachidonsäure auf Chlamydien-infizierte DCs	81
4.1.3	Beeinträchtigung von Mitochondrien während der Infektion von DCs	83
4.1.4	Metabolische Umprogrammierung von DCs während der Infektion.....	87
4.1.5	Deacetylierung von α -Tubulin und funktionale Rolle von HDAC6	91
4.1.6	Aggresomen-vermittelter Abbau von chlamydialen Strukturen.....	96
4.1.7	Beteiligung der aggresomalen Proteine Parkin, HSP25/27 und HDAC6 am autophagosomalen Abbau von Chlamydien	104
4.1.8	Autophagosomaler Abbau von Chlamydien in primären DCs.....	110
4.1.9	Autophagosomaler Abbau in humanen DCs	112
4.2	Rolle von DC-stämmigen Exosomen in der anti-chlamydialen Abwehr.....	116
4.2.1	Isolation und Charakterisierung von Exosomen.....	116
4.2.2	Infektiosität von Exosomen	120
4.2.3	CD95-vermittelte Apoptose durch Exosomen.....	122

Inhaltsverzeichnis

4.2.4	Einfluss von Exosomen auf NK-Zellen.....	124
4.2.5	Funktionale Kooperation von TNF- α und IFN- γ in der Apoptose infizierter und nicht-infizierter Epithelzellen.....	125
4.3	Anti-chlamydiale Abwehr von NK-Zellen.....	130
4.3.1	Infektion von NK-Zellen mit <i>C. psittaci</i>	130
4.3.2	Aktivierung von NK-Zellen während der Infektion.....	133
4.3.3	Freisetzung von Chlamydien durch Degranulierung	135
4.3.4	Reinfektion von NK-Zellen und NK-Zellfunktion.....	145
4.3.5	Infektiosität von Chlamydien aus NK-Zellüberständen	147
4.3.6	Charakterisierung der durch NK-Zellüberstände ausgelösten Immunantwort.....	150
5	Diskussion.....	158
5.1	Zelluläre Selbstverteidigung Chlamydien-infizierter DCs.....	158
5.2	Beteiligung von iExosomen an der Bekämpfung chlamydialer Zellinfektionen	162
5.3	Prozesse anti-chlamydialer Abwehr infizierter NK-Zellen.....	168
5.4	Postulierte Arbeitsmodelle.....	174
5.5	Ausblick für weiterführende Studien	178
	Literaturverzeichnis.....	180
	Abbildungsverzeichnis.....	206
	Tabellenverzeichnis	208
	Anhang	209

Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) und die von ihnen geprägten T-Zellen besitzen eine zentrale Funktion in der anti-chlamydialen Immunantwort. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gelang unter Verwendung von immortalisierten murinen DCs (JAWSII-Zellen) und dem Chlamydienstamm *C. psittaci* (DC15) die erstmalige Identifizierung eines zellautonomen Abwehrweges in infizierten DCs. Diese zelluläre Selbstverteidigung ist dadurch charakterisiert, dass Chlamydien aus strukturell desintegrierten Inklusionen dem Autophagieweg zugeführt werden und es zur Generierung von Antigenen kommt, die mithilfe von MHCI-Molekülen auf der Zelloberfläche von DCs entsprechenden CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden.

Die exakten zellulären Prozesse und biochemischen Abläufe der Desintegration und Autophagie chlamydialer Inklusionen in DCs wurden bisher noch nicht eingehend untersucht. Ziel dieser Arbeit war es daher, unter Einsatz des zuvor etablierten murinen Infektionssystems sowie *C. psittaci* (DC15), den xenophagosomalen Mechanismus der Chlamydienbekämpfung infizierter DCs aufzuklären und weitere, hieran gekoppelte Folgeprozesse und funktionale Interaktionen mit anderen Immunzellen zu charakterisieren.

Die hier in Kombination mit zellbiologischen und biochemischen Assays durchgeführten siRNA-Studien belegen eine funktionale Schlüsselrolle der Phospholipase cPLA2 in der anti-chlamydialen Abwehr infizierter DCs. Des Weiteren sprechen die Resultate dafür, dass es durch die Wirkung der von ihr synthetisierten Arachidonsäure zu einer defekten OXPHOS und verminderten ATP-Produktion der Mitochondrien kommt und dies destruktive Auswirkungen auf die energieparasitären Chlamydien hat. Der Verlust der mitochondrialen Funktion sowie der damit verbundene Vitalitätsverlust der Chlamydien scheinen unmittelbar durch den TNF- α /cPLA2-Signalweg kontrolliert zu werden. Des Weiteren lassen die Ergebnisse der Arbeit folgern, dass die Chlamydieninfektion mit einer metabolischen Umprogrammierung von der OXPHOS zur aeroben Glykolyse in DCs einhergeht. Durch die erhöhte Glykolyserate scheinen die infizierten DCs, den durch die geschädigten Mitochondrien entstehenden Energieverlust, kompensieren zu können.

Die Assoziation der Inklusionen mit stabilen, acetylierten Mikrotubuli spielt eine entscheidende Rolle sowohl für die erfolgreiche Etablierung der Chlamydien als auch deren vesikuläre Versorgung. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen in infizierten DCs eine HDAC6-vermittelte Deacetylierung von Mikrotubuli. Dies führt zu einem Verlust des peri-nukleären Transports bakterieller Vakuolen zum Golgi-Apparat und einer weiteren strukturellen Desintegration der chlamydialen Kompartimente. Der Vorgang ermöglicht es infizierten DCs, die durch cPLA2/Arachidonsäure beeinträchtigten Inklusionen von der vesikulären Versorgung abzukoppeln und durch weitere intrazelluläre Mechanismen zu eliminieren. Die durchgeführten Untersuchungen zum intrazellulären Abbaumechanismus weisen auf eine Aggresomen-vermittelte Xenophagie der bakteriellen Strukturen hin. Massenspektrometrische Analysen der Aggresomen aus DCs sowie die gefundene Beteiligung der mitophagosomalen Schlüsselkomponenten HDAC6, Parkin, Pink-1 sowie

p62 und Ubiquitin belegen einen simultanen auto-/xenophagosomalen Abbau defekter Mitochondrien und desintegrierter Chlamydien. Eine vergleichbare intrazelluläre anti-chlamydiale Abwehr konnte ebenfalls in primären Maus- aber auch humanen DCs bestätigt werden.

Während des Infektionsverlaufs in DCs kommt es parallel zur Auto-/Xenophagie zu einer vermehrten Bildung von Multivesikularkörperchen (MVBs) und einer daran gekoppelten Formation exosomaler Membranvesikel (iDexosomen), die massiv zur Induktion der IFN- γ -Sekretion benachbarter NK-Zellen und so zur Aktivierung einer NK-Zellantwort während der Chlamydieninfektion beitragen. Weitere Untersuchungen zeigen, dass das TNF- α infizierter DCs in Kombination mit dem durch iDexosomen induzierten IFN- γ von NK-Zellen zu einer erhöhten Apoptoseinduktion nicht-infizierter aber auch Chlamydien-infizierter Epithelzellen führt. Dies deutet darauf hin, dass die chlamydiale Subversion der Apoptose infizierter Zellen zu einem gewissen Teil durch eine kombinatorische Wirkung von Exosomen, IFN- γ und TNF- α „ausgehebelt“ werden kann.

Abschließend wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und in welchem Maße die mit DCs kooperierenden NK-Zellen zelluläre Mechanismen besitzen, die eine zelluläre Chlamydieninfektion direkt bekämpfen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass es bei infizierten NK-Zellen zu keinem Zeitpunkt zu einer erfolgreichen chlamydialen Etablierung und zu keiner zyklusvermittelten EB-RB-Differenzierung kommt. Interessanterweise zeigen die infizierten NK-Zellen eine funktionale Reifung, die durch eine erhöhte IFN- γ -Sekretion, CD146-Induktion, PKC- θ -Aktivierung und Granula-Ausschüttung charakterisiert ist und mit einer Freisetzung von nicht-infektiösen EBs einhergeht. Diese Ausschleusung von Chlamydien konnte hier sowohl für immortalisierte als auch primäre NK-Zellen der Maus gezeigt werden und lässt sich durch die pharmakologische Blockierung zellulärer Exozytoseprozesse inhibieren. Chlamydiale Strukturen innerhalb der NK-Zellen weisen in der Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie eine ausgeprägte Co-Lokalisierung mit sekretorischen Granula auf. Es scheint, dass das Granula-lokalisierte und ausgeschüttete Granzym B verantwortlich für den beobachteten Infektionsverlust, der durch NK-Zellen freigesetzten EBs, ist. Die chlamydiale Infektion und Ausschleusung von EBs hat keinen detektierbaren negativen Einfluss auf die Funktion der NK-Zellen. Sie können nach einer Erstinfektion den chlamydialen Infektions- und Ausschüttungsvorgang in einer weiteren Reaktion reproduzieren und besitzen eine zytotoxische Aktivität, die denen nicht-infizierter NK-Zellen entspricht oder sogar leicht erhöht ist. Die von NK-Zellen freigesetzten nicht-infektiösen Chlamydien zeigen eine nachweisbare Immunogenität, die laut IgG-Subklassen-Charakterisierung immunisierter Mäuse zu einer IgG2c-/IgG2b-dominierten Th1-Antwort führt. Die während der Immunisierung generierten anti-chlamydialen Antikörper besitzen zudem die Fähigkeit zur Infektionsneutralisierung bei der Verwendung epithelialer Wirtszellen als Modellsystem.

Im Résumé geben die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit neue und vertiefende Einblicke in die zellulären und molekularen Abwehrmechanismen Chlamydien-infizierter DCs und NK-Zellen sowie in deren funktionale wechselseitige Kooperation während der anti-chlamydialen Immunreaktion durch iDexosomen, TNF- α und IFN- γ .

Summary

Dendritic cells (DCs) and their primed T cells play a central role in the anti-chlamydial immune response. Previous studies from our group using immortalized murine DCs (JAWSII cells) and the chlamydia strain *C. psittaci* (DC15) enabled the first identification of a cell-autonomous defense pathway in infected DCs. This cellular self-defense is characterized by the delivery of chlamydia from structurally disintegrated inclusions to autophagosomal compartments and the generation of antigens presented by MHCI molecules on the cell surface of DCs for the priming and activation of corresponding CD8⁺ T cells.

The exact cellular and biochemical processes responsible for chlamydial disintegration and degradation in DCs have not been studied in detail. Therefore, the aim of this work was to unravel the xenophagosomal mechanism of chlamydial elimination by using the previously established murine DC/*C. psittaci* (DC15) infection system and to further characterize downstream processes as well as functional interactions with other immune cells.

siRNA studies performed in combination with cell biological and biochemical assays demonstrate a key role of phospholipase cPLA2 in the anti-chlamydial defense of infected DCs. Furthermore, the obtained results suggest that cPLA2-synthesized arachidonic acid induces impaired OXPHOS with reduced mitochondrial ATP production, which has destructive effects on the energy-parasitic chlamydia. The loss of mitochondrial function and in turn chlamydial viability appear to be controlled directly by the TNF- α /cPLA2 signaling pathway. Furthermore, the results of this work indicate that chlamydial infection of DCs is associated with metabolic reprogramming from OXPHOS to aerobic glycolysis. Due to the increased glycolysis, infected DCs seem to be able to compensate for the loss of energy caused by damaged mitochondria.

The association of chlamydial inclusions with stable, acetylated microtubules plays a critical role in the successful intracellular establishment of chlamydia and its vesicular supply. Investigations of this work revealed that in infected DCs deacetylation of microtubules occurs via HDAC6. This results in a loss of the peri-nuclear transport of bacterial vacuoles to the Golgi apparatus and to instability of chlamydial compartments. The strategy allows infected DCs to decouple inclusions, which are affected by cPLA2/arachidonic acid, from vesicular transport and to eliminate them via further degradation. Experiments on this proposed mechanism indicate an aggresome-mediated xenophagy of the bacterial remnants. Mass spectrometric analysis of DC-derived aggresomes and the involvement of key mitophagosomal factors (HDAC6, Parkin, Pink-1, p62 and ubiquitin) suggest a simultaneous auto-/xenophagosomal degradation of defective mitochondria together with disintegrated chlamydia. Most importantly, a comparable intracellular anti-chlamydial defense was also found in primary mouse DCs and in human DCs.

During the course of DC infection, auto-/xenophagy is accompanied by increased formation of multivesicular bodies (MVBs) and exosomal membrane vesicles (iDexosomes), which strongly induce

Summary

IFN- γ secretion of adjacent NK cells and thus activate an NK cell response during chlamydial infection. Further studies demonstrate that TNF- α of infected DCs in combination with iDexosome-induced IFN- γ of NK cells result in an increased apoptosis of uninfected but also chlamydia-infected epithelial cells. This suggests that chlamydial subversion of apoptosis in infected cells can be undermined to some extent by the combinatorial influence of exosomes, IFN- γ , and TNF- α .

The final experiments on this topic analyzed whether and to what extent DC-cooperating NK cells use cellular mechanisms that directly combat chlamydial infections. These studies revealed that neither chlamydial establishment nor cycle-mediated EB-RB differentiation occurred in infected NK cells. Most interestingly, infected NK cells displayed a functional maturation characterized by enhanced IFN- γ secretion, CD146-induction, PKC- θ activation, granule secretion, and the release of non-infectious EBs. Chlamydial release was seen for both immortalized and primary mouse NK cells and could be blocked by pharmacological inhibition of cellular exocytosis. Chlamydial structures within infected NK cells show pronounced colocalization with secretory granules in immunofluorescence as well as electron microscopy. The granule-localized and secreted granzyme B seems to be responsible for the observed loss of EB infectivity in NK cells. Chlamydial infection and EB release have no detectable impact on the function of NK cells. After initial infection, NK cells recover and are able to repeat the cellular defense scenario of chlamydial infection and release. Moreover, they retain their cytotoxic activity, which is comparable to non-infected NK cells or even slightly higher. The non-infectious chlamydia released by NK cells show detectable immunogenicity, which, according to IgG subclass characterization of immunized mice, results in an IgG2c-/IgG2b-dominated Th1 response. Moreover, anti-chlamydial antibodies generated during immunization have the ability to neutralize infection when using epithelial host cells as a model system.

In conclusion, the results of this work provide new detailed insights into the cellular and molecular defense mechanisms of chlamydia-infected DCs and NK cells as well as their functional cooperation during the anti-chlamydial immune response via iDexosomes, TNF- α , and IFN- γ .

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
A	Ampere
AA	<i>arachidonic acid</i>
acetyl./act./ac.	acetyliert
Ak	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BGM	<i>buffalo green monkey</i>
BMDCs	<i>bone marrow-derived dendritic cells</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C.	<i>Chlamydia</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
chl.	chlamydiales
cPLA2	zytosolische Phospholipase A2
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cell</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Dexosomen/DEX	DC-stämmige Exosomen
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dtl.	Deutschland
EB	<i>elementary body</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
EVs	extrazelluläre Vesikel
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Golgi-Apparat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HDAC6	Histondeacetylase 6
HMGB-1	<i>high mobility group box 1 protein</i>
hpi	<i>hours post infection</i>
HR	<i>hypersensitive response</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

Hspb1	<i>Heat shock protein b1</i>
iDexosomen/iDEX	Exosomen aus Chlamydien-infizierten DCs
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IFU	<i>inclusion-forming unit</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscoe's modified Dulbecco's medium</i>
IRG	<i>immunity-related GTPases</i>
ISG	Interferon-stimulierte Gene
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LGV	Lymphgranuloma venereum
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorter</i>
MALDI-TOF/TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight tandem</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
miRNA	microRNA
mit.	mitochondriales
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mono	monoklonal
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MT	Mikrotubuli
MTOC	<i>microtubule-organizing center</i>
mTor	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MVBs	<i>multivesicular bodies</i>
NK	<i>natural killer</i>
nLC	<i>nano-scale liquid chromatography</i>
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
Pink-1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC	<i>peptide loading complex</i>
poly	polyklonal
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
PV	parasitophore Vakuole
RB	<i>reticulate body</i>
RIPA	<i>radio-immunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TM	transmembran
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
WB	Western-Blot
xg	Erdbeschleunigung
$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotenzial

1 Einleitung

1.1 Chlamydien

1.1.1 Taxonomie und Krankheitsbilder

Chlamydien sind gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, die als energieparasitäre Pathogene verschiedene Wirtsorganismen von Amöben bis hin zum Menschen infizieren (Bachmann, Polkinghorne, and Timms 2014). Innerhalb der Familie der Chlamydiaceae, der bisher 11 verschiedene Spezies zugeordnet werden, ist die Gattung *Chlamydia* bisher am eingehendsten untersucht (Sachse et al. 2014). Die verschiedenen Chlamydienstämme zeichnen sich durch ihr sehr breites Wirtsspektrum aus (Tab. 1.1) (Horn 2008) und stellen weltweit sowohl für den human- als auch veterinärmedizinischen Bereich ein ernstzunehmendes Problem dar (Borel et al. 2016). Für den Menschen sind insbesondere Infektionen mit den Spezies *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* von zentraler Bedeutung (Malhotra et al. 2013), (Blasi, Tarsia, and Aliberti 2009). ***C. trachomatis*** lässt sich in drei Biovare unterteilen, die noch weiterhin in verschiedene Serovare klassifiziert werden können (Malhotra et al. 2013). Das Trachoma Biovar (Serovare A-C) verursacht das sogenannte Trachom, welches die weltweit häufigste Ursache für infektionsbedingte Erblindungen, insbesondere in Entwicklungsländern, darstellt (Hu, Holland, and Burton 2013). Infektionen, die durch Vertreter des Genitaltrakt Biovars (Serovare D-K) verursacht werden, zählen zu den weltweit am meisten verbreiteten sexuell übertragbaren Erkrankungen (Brunham and Rey-Ladino 2005). Die Problematik ist hier, dass 70-80 % der Genitaltrakt-Infektionen bei Frauen asymptomatisch verlaufen, die Infektion jedoch in 15-40 % der Fälle zum oberen Genitaltrakt hinaufsteigt, was zu schwerwiegenden Folgeschäden wie Verklebung und Vernarbung der Eierstöcke (*pelvic inflammatory disease*), Unfruchtbarkeit sowie Eileiterschwangerschaften führen kann (Malhotra et al. 2013). Das Lymphogranuloma Venereum (LGV) Biovar (Serovare L1-L3) wird ebenfalls sexuell übertragen und verursacht invasive Urogenital- oder anorektale Infektionen (Manavi 2006), (de Vrieze and de Vries 2014). Infektionen mit *C. trachomatis* stehen im Verdacht, die HIV-Verbreitung zu fördern; außerdem wird eine Assoziation mit Gebärmutterhalskrebs vermutet (Malhotra et al. 2013). Der Erreger ***C. pneumoniae*** ist weltweit verbreitet und verursacht Infektionen des Respirationstraktes, wie beispielsweise Pneumonie, Bronchitis, Sinusitis und Pharyngitis (Kuo et al. 1995). Außerdem wird eine Beteiligung des Erregers an Arteriosklerose und an kardiovaskulären Erkrankungen vermutet (Campbell and Kuo 2004). Neben den Spezies *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae*, können die Erreger *Chlamydia psittaci* sowie *Chlamydia abortus*, aufgrund ihres zoonotischen Potenzials, Infektionen beim Menschen verursachen (Rohde et al. 2010). Der natürliche Wirt von ***C. psittaci*** sind Vögel. *C. psittaci*-Infektionen werden beim Menschen demnach

meist durch engen Kontakt mit Vögeln verursacht, wobei die Übertragung hauptsächlich durch die Inhalation kontaminierter Aerosole von nasalen Sekreten oder Fäzes der Vögel erfolgt (Beeckman and Vanrompay 2009). Die resultierende Psittakose, auch Ornithose genannt, führt zunächst zu grippeartigen Symptomen und kann einen harmlosen Verlauf nehmen (Crosse 1990). Betroffen sind hauptsächlich die Lunge sowie andere Organsysteme wie Herz, Leber, Milz, Hirnhaut, Magen-Darm Trakt und das zentrale Nervensystem, in denen sich der Erreger im schweren Krankheitsverlauf manifestieren kann (CDC 2000). In gravierenden Fällen und bei entsprechender Nichtbehandlung kann die Infektion sogar zum Tode führen. Interessanterweise wurde *C. psittaci* als potentieller Auslöser für okuläre adnexale MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*)-Lymphome (OAMLs) (Ferreri et al. 2004) beschrieben. OAML ist die häufigste Form des Non-Hodgkin-Lymphoms im Auge (Margo and Mulla 1998). Bei OAML-Patienten wurde eine hohe Prävalenz der *C. psittaci*-Infektion sowohl in mononukleären Zellen des Blutes als auch in Tumorgewebe festgestellt (Ferreri et al. 2004). Chlamydien sind bekannt dafür, apoptotische Prozesse zu blockieren (Fan et al. 1998), haben auch mitogene Eigenschaften (Rupp et al. 2005) und bedingen wahrscheinlich die polyklonale Zellproliferation *in vivo* (Ferreri, Ernberg, and Copie-Bergman 2009). Es wird daher postuliert, dass persistente mikrobielle Infektionen, die von einer chronischen Reaktion des Immunsystems und einer fortlaufenden Aktivierung von Lymphozyten begleitet werden, eine wichtige Rolle bei der Lymphombildung spielen könnten (Wyatt and Rathbone 1988).

C. psittaci wird in 10 Genotypen eingeteilt, die als A bis G, WC, E/B und M56 (Radomski et al. 2016) bezeichnet werden und für bestimmte Wirtsarten (Vanrompay et al. 1993), (Pannekoek et al. 2008), (Andersen 1997) eine gewisse Präferenz aufweisen. Der Genotyp A ist beispielsweise endemisch bei Papageienvögeln und wird bei exponierten Menschen als häufige Ursache von Atemwegserkrankungen und/oder arterienartigen Symptomen angesehen, während Genotyp E eine mannigfaltige Gruppe von Vogelarten (Van Lent et al. 2012), (Andersen 1997), einschließlich Tauben (Beckmann et al. 2014), Wasservögeln und Truthähnen (Beeckman and Vanrompay 2009) befällt. Obwohl alle aviären Genotypen das Potential haben, Menschen zu infizieren, scheint Genotyp A am häufigsten mit menschlicher Psittakose assoziiert zu sein (Heddema et al. 2015). Lange Zeit galt *C. psittaci* als das alleinige und relevante Pathogen der Psittakose (Covelli, Husky, and Dolphin 1980). Die Entdeckung von "atypischen" Chlamydien und die Beschreibung neuer Chlamydienpezies (*C. gallinacea* und *C. avium*) in infizierten Vögeln ergaben jedoch, dass *C. psittaci* möglicherweise nicht der einzige Erreger der aviären Chlamydiose ist (Sachse et al. 2014), (Zocevic et al. 2012). Es wird zudem vermutet, dass bei chlamydialen Mischinfektionen mit *C. psittaci* möglicherweise *C. avium* und *C. gallinacea* klinische Symptome und Krankheitsmanifestationen verursachen (Szymanska-Czerwinska and Niemczuk 2016). Neben aviären Spezies ist *C. psittaci* (Genotyp WC und M56) ebenfalls in der Lage, eine Reihe weiterer nicht-aviärer Spezies zu infizieren, wie u.a. Rinder, Schafe,

Schweine, Pferde, Enten, Katzen, Nager und Wildtiere (Radomski et al. 2016). Die Rolle von *C. psittaci* in dieser Wirtsgruppe ist bisher noch ungeklärt. Es scheint jedoch, dass *C. psittaci* das Potenzial besitzt, Kälber zu infizieren (mit leichten bis schweren respiratorischen Erkrankungen) (Reinhold et al. 2012). Aufgrund der Beobachtung, dass hier häufig auch subklinische Infektionen hervorgerufen werden, wird die pathogene Signifikanz von nicht-aviären *C. psittaci*-Stämmen bei Rindern intensiv diskutiert. Epidemiologische Befunde deuten jedoch darauf hin, dass bei Rindern Mischinfektionen mit *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. suis* und *C. pecorum* auftreten können (Pantchev et al. 2010). Es wird angenommen, dass "Passagen" von *C. psittaci* durch nicht-aviäre Wirte zu einer Verringerung oder einem Verlust der Virulenz führen können (nicht-aviäre *C. psittaci* Stämme gehören zur Risikogruppe 2, während aviäre Stämme in Risikogruppe 3 eingestuft werden). Der phylogenetisch engste Verwandte von *C. psittaci* ist ***C. abortus***, der endemisch bei Wiederkäuern ist und mit Aborten bei Pferd, Kaninchen, Meerschweinchen, Maus, Schwein und Mensch in Verbindung gebracht wird (Everett, Bush, and Andersen 1999). Die Inkubationszeit beträgt bei Schafen etwa 8 Wochen. Charakteristisch für diese Chlamydiose sind Fehlgeburten in der zweiten Trächtigkeitshälfte sowie die Geburt toter oder lebensschwacher Lämmer. *C. abortus* wird bei Säugetieren oral und sexuell übertragen und kann bei schwangeren Frauen, nach zoonotischer Übertragung, ebenfalls einen Abort auslösen (Pospischil et al. 2002). Weitere Chlamydienstämme (*C. felis*, *C. carviae*, *C. pectorum*, *C. suis* und *C. muridarum*) sowie die von ihnen präferierten Wirte (Katzen, Pferde, Meerschweinchen, Schweine, Koalas, Mäuse sowie Hamster) sind in Tab. 1.1 aufgelistet.

Bis heute existieren keine schützenden Vakzine gegen die meisten Chlamydien-Infektionen und die Behandlung beschränkt sich auf den Einsatz von Antibiotika (Hafner, Wilson, and Timms 2014). Die Antibiotikabehandlung geht jedoch oft mit einer Persistenz der Erreger einher (Goellner et al. 2006), wodurch es nicht selten zu Rückfällen kommt (Mpiga and Ravaoarinoro 2006). Daher ist es von besonderem Interesse, die Wirts-Pathogen-Interaktionen genauer zu untersuchen, um die gewonnenen Kenntnisse für die Entwicklung von patientengerichteten Therapien (sogenannten HDTs, *host directed therapies*) einzusetzen, welche möglicherweise in zukünftigen Behandlungsansätzen die Antibiotikatherapie weitestgehend ersetzen können.

Tab. 1.1 Chlamydiale Systematik und Wirtspräferenz

Ordnung	Chlamydiales	
Familie	Chlamydiaceae	
Gattung	Chlamydia	
Spezies	<i>C. abortus</i>	Schafe, Wiederkäuer, Schweine, Vögel, Menschen (Zoonose)
	<i>C. psittaci</i>	Nutzgeflügel, Vögel, Schweine, Menschen (Zoonose), Nager
	<i>C. felis</i>	Katzen
	<i>C. carviae</i>	Pferde, Meerschweinchen
	<i>C. pectorum</i>	Wiederkäuer, Schweine, Koalas
	<i>C. pneumoniae</i>	Menschen, Koalas, Amphibien, Reptilien
	<i>C. trachomatis</i>	Menschen
	<i>C. suis</i>	Schweine
	<i>C. muridarum</i>	Mäuse, Hamster
	<i>C. avium</i> sp. nov	Tauben, Papageien
	<i>C. gallinacea</i> sp. nov	Nutzgeflügel

1.1.2 Intrazelluläre Replikation und Persistenz

Chlamydien sind aufgrund ihrer intrazellulären Lebensweise essentiell auf eine Wirtszelle angewiesen und zeichnen sich durch einen einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus aus (Abb. 1-1) (Bedson 1932). Dieser charakterisiert sich durch das Vorkommen zweier morphologisch und funktional unterschiedlicher Erscheinungsformen, den Elementar- (*Elementary Bodies*, EBs) und Retikularkörperchen (*Reticulate Bodies*, RBs) (Rockey, Fischer, and Hackstadt 1996) (Abb. 1-1). Bei den 0,2-0,3 µm großen EBs handelt es sich um die infektiöse Form der Chlamydien, die neuen Erkenntnissen nach biosynthetisch aktiv ist und sich insbesondere durch die Expression von Proteinen des Glukosekatabolismus auszeichnet (Omsland et al. 2014), (Saka et al. 2011). Es wird vermutet, dass diese Proteine für den Eintritt in die Zelle sowie die Differenzierung in RBs benötigt werden. Die 0,5-1 µm großen RBs hingegen stellen die nicht infektiöse und ebenfalls metabolisch

aktive Form der Chlamydien dar (Rockey, Fischer, and Hackstadt 1996). Im Gegensatz zu EBs, die auf maximale Infektiosität ausgelegt sind, sind RBs auf Replikation und Nährstoffwerb spezialisiert und exprimieren demnach vorwiegend Proteine, die mit dem Nährstofftransport, der Proteinsynthese sowie der ATP-Verwertung assoziiert sind (Bastidas et al. 2013), (Saka et al. 2011). Während des Entwicklungszyklus der Chlamydien, infizieren EBs mukosale Zellen und bilden innerhalb dieser eine parasitophore Vakuole (PV), auch Inklusion genannt, aus (Abb. 1-1) (Abdelrahman and Belland 2005). Bereits nach zwei Stunden beginnt die Differenzierung der EBs zu RBs und die Vermehrung letzterer durch binäre Zellteilung (Abdelrahman and Belland 2005). Nach 18-24 Stunden und multiplen Replikationsrunden, re-differenzieren die RBs wieder zu EBs und verlassen nach circa 48 Stunden letztendlich durch Zelllyse oder Extrusion die Zelle, um Nachbarzellen zu infizieren (Hybiske and Stephens 2007). Durch verschiedene Faktoren, wie u.a. Nährstoffmangel (z.B. Tryptophan, Eisen), Wirtszell-Zytokine (z.B. IFN- γ) und Antibiotika, kann der Entwicklungszyklus der Chlamydien reversibel angehalten werden (Hogan et al. 2004). RBs gehen dabei in die Persistenz über, die sich durch eine unnormal vergrößerte Form kennzeichnet und mit einer reduzierten Stoffwechselaktivität sowie einer verringerten Synthese von Membranproteinen einhergeht (Beatty, Morrison, and Byrne 1994). Oftmals sind persistente Formen resistent gegen Antibiotika (Hogan et al. 2004), was zu immer wiederkehrenden Infektionen und chronischen Erkrankungen führen kann (Brunham and Rey-Ladino 2005). Die IFN- γ -induzierte Persistenz geht auf eine, durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)-vermittelte, Tryptophan-Depletion zurück (Beatty, Morrison, and Byrne 1994).

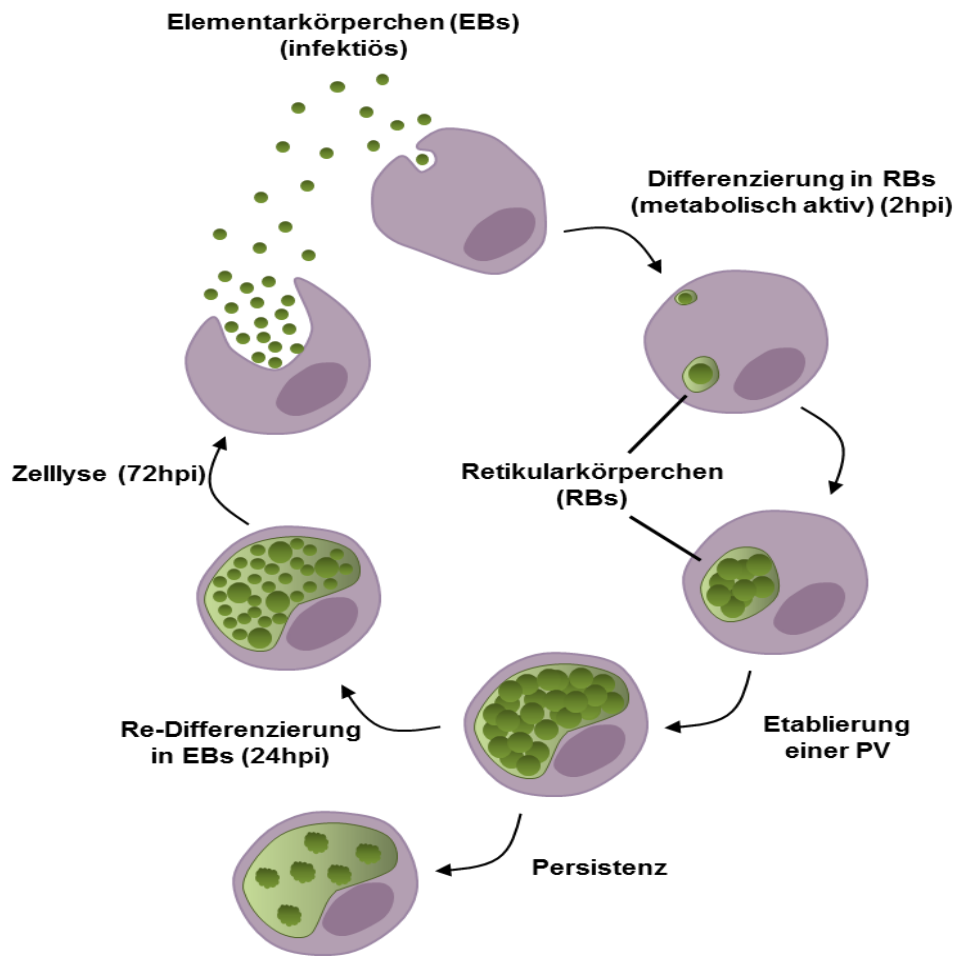


Abb. 1-1 Biphasischer Entwicklungszyklus von Chlamydien (modifiziert nach Brunham *et al.*, 2005)

Infektiöse Elementarkörperchen (EBs) infizieren die Wirtszelle und differenzieren zu hoch metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RBs). Diese bilden innerhalb der Zelle eine parasitophore Vakuole (PV) aus, vermehren sich durch binäre Zellteilung und re-differenzieren letztendlich zu infektiösen EBs. Diese verlassen durch Zelllyse oder Extrusion die Wirtszelle, um Nachbarzellen zu infizieren. Durch verschiedene Faktoren (Nährstoffmangel, IFN- γ und/oder Antibiotika), können Chlamydien in ein reversibles Persistenzstadium übergehen. hpi: *hours post infection*.

1.1.3 Wirts-Pathogen Interaktionen

Im Rahmen der Co-Evolution von Chlamydien und ihren entsprechenden Wirtszellen, haben die Pathogene eine Reihe an Strategien und Mechanismen entwickelt, um die Etablierung ihrer Inklusion sowie deren Versorgung mit essentiellen Metaboliten zu gewährleisten (Hackstadt, Scidmore, and Rockey 1995). Eine bedeutende Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), welches es den Erregern trotz ihrer Lokalisation innerhalb der membranumschlossenen Inklusion erlaubt, über sogenannte Effektorproteine mit ihrer zytosolischen Umgebung in Kontakt zu treten und metabolische Funktionen der Wirtszelle sowie bestimmte Abwehrmechanismen zu ihren Gunsten zu modifizieren (Peters *et al.* 2007).

Bei der Aufnahme von EBs dienen chlamydiale Oberflächenproteine und verschiedene Adhäsine, wie Glykosaminoglykane (Menozzi et al. 2002), MOMP (*major outer membrane protein*) (Su et al. 1996), OmcB (*outer membrane complex protein B*) (Fadel and Eley 2007), HSP70 und PmpD (*polymorphic membrane protein D*) (Molleken, Schmidt, and Hegemann 2010) als Liganden für Wirtszellrezeptoren, wie Fibronectin (Bastidas et al. 2013), (Kleba et al. 2002). Der Aufnahmeprozess kann dabei vermutlich in zwei Schritte unterteilt werden, wobei im ersten Schritt die Interaktion der EBs mit zellulären Heparansulfat-Proteoglykanen erfolgt (Chen and Stephens 1994) und im zweiten Schritt eine hochaffine Bindung zu Wirtszellrezeptoren aufgebaut wird (Dautry-Varsat, Subtil, and Hackstadt 2005). Abhängig von Spezies und Zelltyp kann die Aufnahme über Phagozytose (Finlay and Cossart 1997) oder Rezeptor-vermittelte Endozytose (Hodinka et al. 1988) erfolgen. Durch die Adhäsion von EBs an die Wirtszelle kommt es zur Injektion des *translocated actin-recruiting phosphoprotein* (TARP) über das T3SS ins Zytosol (Clifton et al. 2004). Dies hat eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts zur Folge und führt letztendlich zur Internalisierung von EBs in die Wirtszelle (Carabeo et al. 2002), (Jewett et al. 2010). Die Rekrutierung von Aktin und weiteren Intermediärfilamenten, wie Vimentin, dienen als Art Gerüst der strukturellen Stabilisierung der chlamydialen Inklusion (Kumar and Valdivia 2008). Nach dem Eintritt der Chlamydien in die Wirtszelle wird die Fusion mit lysosomalen Kompartimenten verhindert, indem sich die frühe chlamydiale Inklusion mit Rab11 und Rab14 dekoriert und sich somit als langsames Recycling-Endosom tarnt (Molleken and Hegemann 2017). Im frühen Entwicklungsstadium erfolgt außerdem eine Dynein-abhängige Translokation der Inklusion entlang von Mikrotubuli zum Mikrotubuli organisierenden Zentrum (MTOC) (Grieshaber, Grieshaber, and Hackstadt 2003). Damit gelangen die Chlamydien in eine nahe Lokalisation zum Golgi-Apparat (Scidmore 2011). Circa 12 Stunden nach Eintritt in die Zelle wird die chlamydiale Inklusion außerdem von Mikrotubuli-Käfigen umhüllt, welche reich an posttranslational modifiziertem (PTM) α -Tubulin, insbesondere acetyliertem und detyrosiniertem Tubulin sind (Al-Zeer et al. 2014). Das Inklusionsprotein CT813 ist dabei für die Rekrutierung der ARF-GTPasen ARF1 und ARF4 zur Inklusionsmembran verantwortlich, wo diese die PTM der Mikrotubuli herbeiführen (Molleken and Hegemann 2017). Die entstandenen Mikrotubuli-Käfige werden dann genutzt, um Golgi-Ministacks um die Inklusion zu positionieren (Al-Zeer et al. 2014), (Al-Younes et al. 2011). Die Fragmentierung des Golgi-Komplexes sowie seine Positionierung um die wachsende Inklusion sind wichtig für die erhöhte Nährstoff- und Lipidzufuhr und damit die Entwicklung, Teilung und das Wachstum der Chlamydien innerhalb der Inklusion (Saka and Valdivia 2010). Rab6, Rab11 und Rab14 vermitteln dabei die Lipidversorgung des Golgi-Apparats (Damiani, Gambarte Tudela, and Capmany 2014), wohingegen Rab39 an der Lipidzufuhr von Multivesikularkörperchen (MVBs) beteiligt ist (Gambarte Tudela et al. 2015). Da Chlamydien nur über eine sehr begrenzte Nukleotid-Synthese verfügen, sind sie außerdem auf den zellulären Energiestoffwechsel angewiesen (Stephens et al. 1998). Ab etwa 10

hpi erfolgt daher bei einigen Chlamydienspezies (insbesondere *C. psittaci*) die Rekrutierung von Mitochondrien mithilfe von Kinesin zur chlamydialen Inklusion (Escalante-Ochoa et al. 1999). Es wird vermutet, dass Chlamydien über den TIM/TOM-Komplex Typ-III-Sekretionsproteine in die Mitochondrien transportieren und so die Mitochondrienfunktionen modellieren (Derre et al. 2007). Damit erhalten sie vermutlich Zugang zu energiereichen Phosphaten sowie Lipiden und Aminosäuren von Seiten der Mitochondrien. Chlamydien modulieren auch die Apoptose der Wirtszelle (Ying et al. 2007). Dabei sind sie, abhängig vom Infektionsstatus, sowohl in der Lage die Apoptose zu inhibieren (Greene et al. 2004), als auch gezielt zu induzieren (Ojcius, Souque, et al. 1998). Insbesondere für das vollständige Durchlaufen des Replikationszyklus sowie für chronische Infektionen ist die Inhibition der Apoptose von besonderer Bedeutung für die Pathogene (Sharma and Rudel 2009). Es wird angenommen, dass Chlamydien die Apoptose in frühen Stadien der Infektion auf mitochondrialem Level blockieren. Realisiert wird dies durch die MAPK-abhängige Hochregulation der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und cIAP2 (Rajalingam et al. 2008), (Rajalingam et al. 2006). Während die Hochregulation von Mcl-1 die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und somit den Austritt von Smac und Cytochrom c ins Zytosol verhindert, führt die cIAP-2-Hochregulation zur direkten Blockierung der Caspase-3-Aktivierung (Rajalingam et al. 2007), (Rajalingam et al. 2006). Dadurch, sowie durch die Herunterregulation der TNFR1-Oberflächenexpression während der Infektion (Paland et al. 2008), wird die TNF-vermittelte Apoptose verhindert. Des Weiteren konnte eine Infektions-bedingte Inhibition der Fas-vermittelten Apoptose in Zellen gezeigt werden, die essentiell auf die Beteiligung von Mitochondrien für die Apoptoseinduktion angewiesen sind (Fischer et al. 2004). Dabei spielt das chlamydiale Protein CADD eine entscheidende Rolle, das die Induktion der Apoptose durch Bindung und Rekrutierung von Fas zur chlamydialen Inklusion verhindert (Stenner-Liewen et al. 2002).

1.2 Aufbau des Immunsystems

Das Immunsystem der Vertebraten stellt ein hochkomplexes Abwehrsystem dar, dessen Hauptaufgabe darin besteht, den Organismus vor pathogenen Mikroorganismen zu schützen und folglich die Integrität desselben zu erhalten. Ein funktionales Immunsystem erkennt schädliche Pathogene und bekämpft sie in effizienter Weise. Chlamydien infizieren hauptsächlich epitheliale Zellen, die Organe und Schleimhäute bedecken. Wenn Chlamydien in den Wirtsorganismus eindringen und dort eine entsprechende Infektion auslösen, werden sie erkannt und eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Mechanismen der Immunabwehr aktiviert. Funktional kann das Immunsystem in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt werden, wobei beide Arme des

Immunsystems sowohl zelluläre als auch humorale Komponenten besitzen und eng miteinander verzahnt sind (Parkin and Cohen 2001). Während das angeborene Immunsystem eine Erreger-unspezifische Immunantwort auslöst, zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch seine hohe Spezifität und die Ausbildung eines langanhaltenden immunologischen Gedächtnisses aus (Ahmed and Gray 1996). Vertreter des angeborenen Immunsystems sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen (DCs) und das Komplementsystem. T- und B-Zellen sowie Antikörper hingegen, stellen Vertreter des adaptiven Immunsystems dar (Parkin and Cohen 2001).

1.2.1 Angeborenes Immunsystem

Im Verlauf einer Infektion treffen Chlamydien auch auf Zellen und Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems, welches eine wichtige Rolle für die frühe Detektion und Eliminierung der Infektion spielt. Das angeborene Immunsystem umfasst die Erreger-unspezifische Abwehr des Organismus, welche sich insbesondere durch ihre zeitnahe Aktivierung auszeichnet. Die entscheidende erste Abwehrlinie gegen Pathogene wird durch anatomische und physiologische Barrieren gebildet, wie die Haut, mukoziliäre Abwehrmechanismen, einen niedrigen pH-Wert sowie bakteriolytische Enzyme in Tränen, Speichel und weiteren Sekreten (Turvey and Broide 2010). Kommt es lokal zur Infektion und damit zur Überwindung der ersten physikalischen Schutzbarrieren, sezernieren infizierte Zellen bestimmte pro-inflammatorische Zytokine, wodurch neutrophile Granulozyten und Makrophagen zum Infektionsort rekrutiert werden (Luster, Alon, and von Andrian 2005), (Peters and Ernst 2003). Diese erkennen die Pathogene mithilfe eines begrenzten Repertoires an Keimbahn-codierten Rezeptoren (*pattern recognition receptors* , PRRs), welche mikrobielle konservierte molekulare Strukturen erkennen (*pathogen associated molecular patterns* (PAMPs)), die von einer großen Vielfalt an Mikroorganismen codiert werden. Beispielsweise erkennt der *Toll-like receptor 4* (TLR4) das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien (Bell et al. 2003). Neben PAMPs werden durch PRRs außerdem *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) detektiert. Bei diesen handelt es sich um Moleküle, die in Folge der Zellyse und Gewebsschädigung hochreguliert und freigesetzt werden. Prominente Vertreter sind darunter u.a. das *high mobility group box 1 protein* (HMGB-1) und weitere endogene Alarmine, *Heat-Shock* Proteine (HSPs) und Harnsäure (Bianchi 2007). Nach der Erkennung erfolgt die Phagozytose und intrazelluläre Abtötung der Pathogene durch die Produktion reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies (Bogdan, Rollinghoff, and Diefenbach 2000). Durch die Sekretion von Chemokinen werden außerdem Effektorzellen, wie DCs, rekrutiert und eine primäre Immunantwort eingeleitet (Luster, Alon, and von Andrian 2005). Zu

den weiteren Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören außerdem das Komplementsystem und NK-Zellen (Turvey and Broide 2010). Beim Komplementsystem handelt es sich um eine enzymatische Reaktionskaskade, die über die Spaltung verschiedener Plasmaproteine zur Opsonierung oder direkten Abtötung der Mikroorganismen führt (Tomlinson 1993). Opsonierte Pathogene werden im Folgenden durch Phagozyten eliminiert, wohingegen die Abtötung infizierter Zellen durch NK-Zellen vermittelt wird (Turvey and Broide 2010). NK-Zellen erkennen infizierte Zellen anhand bestimmter aktivierender Rezeptoren. Zu den bedeutendsten inhibitorischen Rezeptoren für NK-Zellen zählen MHCI-Moleküle, die konstitutiv von gesunden Zellen exprimiert werden (Pegram et al. 2011). Infolge der NK-Zellaktivierung schütten diese bestimmte Effektormoleküle aus, die in infizierten Zellen zur Apoptoseinduktion führen (Biron et al. 1999). Auf die Funktionen von NK-Zellen während der Immunantwort wird in Kapitel 1.2.6 noch näher eingegangen. Das ursprüngliche Dogma, dass die angeborene Immunität kein immunologisches Gedächtnis aufbauen kann, wurde kürzlich durch aktuelle Studien in Frage gestellt. Diese konnten belegen, dass angeborene Immunantworten in Organismen ohne adaptive Immunantworten eine effektive Abwehr gegen Reinfektion bilden (Netea et al. 2015). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Schutz vor einer Reinfektion auch unabhängig von T- und B-Lymphozyten (Kapitel 1.2.2) erfolgen kann (Netea et al. 2015). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass auch die angeborene Immunität erlernte Eigenschaften nach einer Infektion mit Pathogenen oder ihren Produkten zeigen kann. Diese Art des immunologischen Gedächtnisses wird als "trainierte Immunität" oder "angeborenes Immungedächtnis" bezeichnet (Netea et al. 2016).

1.2.2 Adaptives Immunsystem

Wenn Chlamydien in den Wirtsorganismus eindringen, wird neben dem angeborenen, nach entsprechender Zeitspanne, auch das adaptive Immunsystem aktiviert. Dieses zeichnet sich insbesondere durch seine hohe Spezifität aus, was die Erkennung einer großen Vielfalt an Erregern ermöglicht (Cooper and Alder 2006). Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erfolgt hier jedoch keine unmittelbare Aktivierung von Abwehrmechanismen. Vielmehr kann es einige Tage in Anspruch nehmen, bis die spezifisch an den entsprechenden Erreger angepasste Immunantwort aufgebaut ist (Bonilla and Oettgen 2010). Nach erfolgter Aktivierung führt das adaptive Immunsystem jedoch zu einer stärkeren und effektiveren Immunantwort und bietet zudem langanhaltenden Schutz vor einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen (immunologisches Gedächtnis der adaptiven Immunität) (Ahmed and Gray 1996). Das adaptive Immunsystem lässt sich in eine humorale sowie zelluläre Immunantwort unterteilen (Parkin and Cohen 2001). Für die

humorale adaptive Abwehr sind B-Lymphozyten verantwortlich. Sie erkennen ihr spezifisches Antigen durch membrangebundene Antikörper, die sie auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Loder et al. 1999). Infolge der Bindung des entsprechenden Antigens an den membrangebundenen Antikörper kommt es zur Aktivierung und Proliferation. Die dabei entstehenden Plasmazellen synthetisieren und sezernieren große Mengen des jeweiligen Antikörperklons in ihre Umgebung (Arpin et al. 1995). Abhängig vom jeweiligen Antigen, gegen das die Antikörper gerichtet sind, werden unterschiedliche Reaktionen in Gang gesetzt. Zum einen können die Antikörper an bakterielle Toxine, virale Partikel oder andere lösliche Proteine binden und sie somit neutralisieren. Zum anderen sind sie in der Lage, Mikroorganismen zu opsonieren (Bonilla and Oettgen 2010). An dieser Stelle greift dann wiederum das angeborene Immunsystem ein, indem Antigen-Antikörper-Komplexe entweder direkt durch Phagozyten aufgenommen und abgebaut werden oder das Komplementsystem aktiviert wird und die Lyse der Pathogene erfolgt (Rajewsky 1996). Der zelluläre Teil des adaptiven Immunsystems wird durch T-Lymphozyten gebildet, die sich weiterhin in CD4-positive ($CD4^+$) und CD8-positive ($CD8^+$) T-Zellen unterteilen lassen (Bonilla and Oettgen 2010). Beide Zelltypen zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihr entsprechendes Antigen nur in vorprozessierter Form als Komplex mit körpereigenen Molekülen erkennen (Davis and Bjorkman 1988). Die sogenannten *major histocompatibility complex* I und II (MHC I und MHC II)-Oberflächenproteine binden Peptidantigene und sind in der Lage, zusammen mit co-stimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) T-Zellen über ihre spezifischen T-Zell-Rezeptoren (CD28) zu aktivieren (Chambers and Allison 1997). Eine bedeutende Rolle spielen in diesem Zusammenhang DCs, als zellulärer Bestandteil des angeborenen Immunsystems, worauf in Kapitel 1.2.3 noch näher eingegangen wird. Je nach exprimiertem Glykoprotein auf der Oberfläche, erfüllen T-Zellen unterschiedliche Aufgaben. $CD4^+$ T-Zellen, die auch als Helferzellen bezeichnet werden, erkennen ihr entsprechendes Antigen im Kontext mit MHC II-Molekülen (Bonilla and Oettgen 2010). Die Hauptaufgabe von $CD4^+$ T-Zellen besteht in der Sekretion bestimmter Zytokine und damit der Orchestrierung der Immunantwort (Noelle and Snow 1992). Entsprechend des Zytokinprofils lassen sich aktivierte $CD4^+$ T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen einteilen (Constant and Bottomly 1997). Während Th1-Zellen insbesondere IL-2, IFN- γ und TNF- α sezernieren und zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen aktivieren (Szabo et al. 2000), charakterisieren sich Th2-Zellen durch die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und die Aktivierung von B-Zellen (Paul and Seder 1994). $CD8^+$ T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen im Kontext mit MHC-I-Molekülen. $CD8^+$ T-Zellen proliferieren und differenzieren nach Antigenkontakt zu zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic lymphocytes*, CTLs). Treffen CTLs erneut auf ihr spezifisches Antigen, induzieren sie mittels lytischer Granula Apoptose in infizierten Zellen sowie Krebszellen (Shresta et al. 1998). Realisiert wird dies durch porenbildende Perforine, die das Eindringen in die Zielzelle ermöglichen sowie Granzyme, die als Serinproteasen die Apoptosekaskade in Gang setzen (Barry and Bleackley 2002). Neben der Sekretion lytischer Granula sezernieren $CD8^+$ T-

Zellen nach Antigenkontakt außerdem IFN- γ , welches Makrophagen aktiviert und lokal für eine erhöhte MHC-I-Oberflächenexpression sorgt (Stout and Bottomly 1989). Ein Teil der aktivierten B- und T-Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen aus. Diese haben eine überdurchschnittliche Lebensdauer und sind in der Lage schneller auf Reinfektionen reagieren zu können (Ahmed and Gray 1996).

1.2.3 Funktion dendritischer Zellen im Immunsystem

Dendritische Zellen (DCs) gehören neben Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) des Immunsystems (Lanzavecchia and Sallusto 2001) und werden oft als Wächterzellen bezeichnet (Banchereau and Steinman 1998). DCs spielen eine essentielle Rolle als Vermittler zwischen den beiden Armen des Immunsystems und sind spezialisiert auf die Einleitung adaptiver Immunantworten (Kapsenberg 2003). In ihrem unreifen Stadium patrouillieren sie den Organismus auf der Suche nach Fremdanthigenen. Erkennen sie ein solches mithilfe von PRRs auf der Zelloberfläche, stellen sie ihre Phagozytoseaktivität weitestgehend ein und durchlaufen ein komplexes Differenzierungsprogramm. Dabei kommt es zur Expression bestimmter Chemokinrezeptoren, wie CCR-7, wodurch ihnen die Migration in lymphoide Organe ermöglicht wird (Saeki et al. 1999). Außerdem werden die phagozytierten Fremdanthigene in einem Vorgang, der als Antigenprozessierung bezeichnet wird, in Peptid-Antigene degradiert. Diese werden im Anschluss auf MHC-Moleküle geladen und letztendlich als MHC-Antigen-Komplex auf der Oberfläche T-Zellen präsentiert (Lanzavecchia and Sallusto 2001). Abhängig davon, an welche MHC-Klasse das Antigen gebunden wurde, erfolgt die Präsentation an CD8⁺ (MHC-I) oder CD4⁺ (MHC-II) T-Zellen (Lanzavecchia and Sallusto 2001). Die Auswahl des Präsentationsweges wird dabei durch die Art des Fremdanthigens sowie den Ort der Antigenprozessierung bestimmt (Steinman 1991). Die Präsentation von Antigenen, die von intrazellulär-replizierenden Mikroorganismen stammen, erfolgt im Kontext mit MHC-I-Molekülen (Goldberg and Rock 1992). Die Antigene extrazellulärer Mikroorganismen hingegen werden nach der Prozessierung innerhalb endosomaler Kompartimente im Kontext mit MHC-II-Molekülen präsentiert (Watts 2001). Während generell alle Kern-haltigen Zellen zur MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation befähigt sind, ist die MHC-II-vermittelte Präsentation ein Privileg professioneller APCs. Neben den beiden erwähnten Wegen der Antigenpräsentation ist außerdem der Weg der Kreuzpräsentation für DCs beschrieben, auf den im folgenden Kapitel noch detaillierter eingegangen wird (Berard et al. 2000). DCs stellen keine homologe Zellpopulation dar und können hinsichtlich ihrer Lokalisation, Zytokinsekretion und CD-Oberflächenmerkmale in vier verschiedene Subpopulationen unterteilt werden: klassische DCs (cDCs), plasmazytoide DCs (pDCs), Langerhans

Zellen und monozytische DCs (moDCs) (Satpathy et al. 2012). Bei den klassischen DCs handelt es sich um hoch spezialisierte APCs, die sich durch eine hohe endozytotische Aktivität auszeichnen (Mellman and Steinman 2001). Sie können nach ihren migratorischen Eigenschaften weiterhin in *lymphoid-organ resident* DCs und *peripheral/migratory* DCs unterteilt werden (Satpathy et al. 2012). pDCs charakterisieren sich durch ihre schnelle und massive Produktion an Typ I-Interferonen als Antwort auf viralen Kontakt (Colonna, Trinchieri, and Liu 2004). Langerhans Zellen sind aufgrund ihrer Lokalisation in der Epidermis von besonderer Bedeutung für die Generierung adaptiver Immunantworten gegen Antigene, welche die Hautbarriere überwinden können (Igyarto and Kaplan 2013). Die Hauptaufgabe von moDCs liegt in der Antigenpräsentation sowie der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α (Serbina et al. 2003). Außerdem zeichnen sie sich durch ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation aus (Berard et al. 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten JAWSII-Zellen gehören dieser Subpopulation an (Jorgensen, Haase, and Michelsen 2002), (Jiang et al. 2008).

1.2.4 Mechanismen der MHCI-Antigenpräsentation

Durch die auf der Zelloberfläche im Kontext mit MHCI-Molekülen präsentierten Peptidantigene, erlangt das Immunsystem entscheidende Informationen über den Status der präsentierenden Zelle (Gleimer and Parham 2003). Auf diese Weise ist eine Differenzierung zwischen infizierten oder entarteten, von gesunden Zellen möglich. Die von gesunden Zellen präsentierten Peptide werden durch das überwachende Immunsystem ignoriert. Ist eine Zelle mit einem Pathogen infiziert oder durch Mutation entartet, werden die von ihr präsentierten Antigene von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt und die Zelle letztendlich eliminiert (Rock, Farfan-Arribas, and Shen 2010). Wie bereits erwähnt, sind alle kernhaltigen Körperzellen in der Lage, Peptidantigene über MHCI-Moleküle zu präsentieren. Hauptsächlich werden Antigenpeptide, die von zytosolischen Peptiden stammen, wie beispielsweise viralen Proteinen, auf MHCI-Moleküle geladen (Gromme and Neefjes 2002). Insbesondere durch DCs und zu einem geringeren Ausmaß auch durch Makrophagen und B-Zellen ist außerdem die Präsentation extrazellulärer Antigene mithilfe von MHCI-Molekülen möglich (Berard et al. 2000). Dieser Prozess wird auch als Kreuzpräsentation bezeichnet. Bei MHCI-Molekülen handelt es sich um Heterodimere, die aus einer, an die Zellmembran verankerten, schweren Kette (einem integralen Membranglykoprotein) und dem löslichen Protein β 2-Mikroglobulin bestehen. Im Proteinkomplex können vier Domänen unterschieden werden: die extrazelluläre Region der schweren Kette faltet sich in drei Domänen (α 1, α 2 und α 3), die vierte Domäne bildet β 2-Mikroglobulin (Jones 1997). Die α 1- und α 2-Domäne bilden zusammen die Peptid-

Bindestelle, eine Furche auf der oberen Oberfläche des MHCI-Moleküls, die Antigenpeptide einer Länge von 8-10 Aminosäuren bindet (Raghavan et al. 2008). Entscheidend für die Bindung sind dabei die beiden Ankerreste der Peptide, die mit den Bindungstaschen der MHCI-Moleküle interagieren (Bouvier and Wiley 1994). Dadurch, dass jedes MHCI-Allel unterschiedliche Bindungstaschen aufweist, kommen verschiedene Präferenzen für Peptidantigene zustande (Falk et al. 1991). Die Faltung und Assemblierung der MHCI-Moleküle erfolgt innerhalb des ER-Lumens. Die Generierung der Peptide für den **klassischen Präsentationsweg** hingegen findet vor allem im Zytosol durch Prozessierung endogener Proteine statt (Gromme and Neefjes 2002). Die durch das Proteasom in kurze Peptide gespaltenen Proteine müssen daher im Anschluss vom Zytosol ins ER-Lumen transportiert werden. Diese Translokation erfolgt über den ABC-Peptidtransporter-Komplex TAP1/2 (Rock et al. 1994), (Uebel and Tampe 1999). Angekommen im ER werden die Peptide durch den *peptide loading complex* (PLC) auf leere MHCI-Moleküle geladen (Cresswell et al. 1999). Neben den unbeladenen MHCI-Molekülen und dem TAP1/2-Transporter besteht der PLC zudem aus den beiden Chaperonen Tapasin und Calreticulin, der Proteindisulfidisomerase (PDI) sowie der Reduktase ERp57 (Rufer, Leonhardt, and Knittler 2007), (Blees et al. 2017). Tapasin dient dabei als Brücke zwischen dem MHCI/Chaperon-Komplex und TAP1/2 und wird außerdem benötigt, um die Bindung hoch affiner Peptide an MHCI-Moleküle zu vermitteln (Williams et al. 2002). Nachdem die Peptide auf MHCI-Moleküle geladen wurden, erfolgt die Dissoziation des Peptid-MHCI-Komplexes vom PLC. Schließlich verlässt der Peptid-MHCI-Komplex über den sekretorischen Weg das ER in Richtung Zelloberfläche, wo die Präsentation der Peptide an CD8⁺ T-Zellen erfolgt (Rufer, Leonhardt, and Knittler 2007). Wie bereits erwähnt sind APCs und darunter insbesondere eine DC-Subpopulation, die CD8α und CD103 exprimiert, in der Lage, auch extrazelluläre Antigene auf MHCI-Molekülen zu präsentieren (Cruz et al. 2017).

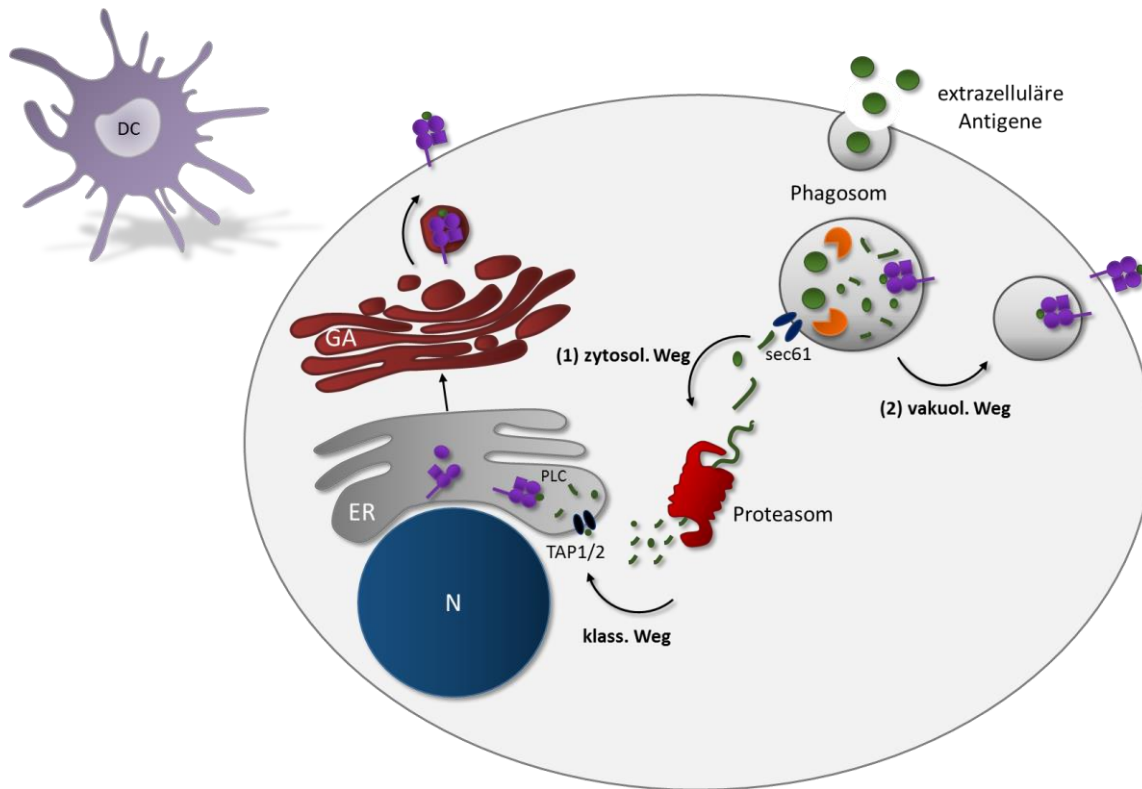


Abb. 1-2 Schematische Darstellung der verschiedenen Kreuzpräsentationswege

Die Kreuzpräsentation kann über den zytosolischen Weg (zytosol. Weg) oder über den vakuolären Weg (vakuol. Weg) erfolgen. Beim zytosolischen Weg (1) werden die extrazellulären Antigene innerhalb von Endosomen vorprozessiert, mittels sec61 ins Zytosol transportiert und im Proteasom weiterprozessiert. Letztendlich erfolgt die Einspeisung der Peptidantigene über den TAP1/2-Transporter in den klassischen MHC-I-Beladungsweg (klass. Weg). Beim vakuolären Weg (2) werden die Antigene nach der Prozessierung in Endosomen direkt auf re-zirkulierende MHC-I-Moleküle geladen und zur Plasmamembran transportiert. ER: Endoplasmatisches Retikulum, GA: Golgi-Apparat, N: Nukleus, PLC: *peptide loading complex*.

Dieser als **Kreuzpräsentation** bezeichnete Mechanismus spielt eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung viraler und bakterieller Infektionen sowie der Abstoßung von Transplantaten und kann auf einem TAP-/Proteasom-abhängigen und -unabhängigen Weg erfolgen (Neefjes and Sadaka 2012) (Abb. 1-2). Bei beiden Wegen werden die extrazellulären Antigene zunächst durch drei Transportwege von APCs aufgenommen- der Rezeptor-vermittelten Endozytose, Phagozytose und Makropinozytose. Während Makrophagen hauptsächlich Phagozytose nutzen, bevorzugen DCs die Aufnahme extrazellulärer Antigene mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose (Gruenberg and van der Goot 2006). In den meisten Fällen erfolgt die Kreuzpräsentation nach dem TAP/Proteasom-abhängigen Weg, der auch als **zytosolischer Weg** bekannt ist (Joffre et al. 2012). Dabei werden die extrazellulären Antigene nach einer ersten endosomal Vorprozessierung, mithilfe des essentiellen Transporters Sec61, ins Zytosol transportiert, wo die weitere Prozessierung der Peptidantigene im Proteasom erfolgt (Rock 2006). Letztendlich werden die Peptidantigene durch den TAP1/2-Transporter in den klassischen MHC-I-Beladungsweg eingespeist (Abb. 1-2). Beim TAP-/Proteasom-

unabhängigen Weg, der auch als **vakuolarer Weg** bezeichnet wird, werden die Antigene nach der endosomalen Prozessierung direkt auf rezirkulierende MHCI-Moleküle geladen und zur Plasmamembran transportiert (Shen et al. 2004) (Abb. 1-2). Beide Wege scheinen nicht strikt voneinander trennbar zu sein und verlaufen vermutlich parallel zueinander ab (Rock and Shen 2005).

1.2.5 Exosomen und ihre immunologischen Aufgaben

Bei Exosomen handelt es sich um extrazelluläre Vesikel (EVs) endosomalen Ursprungs, die von den meisten Zelltypen sezerniert werden und eine bedeutende Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation spielen (Bang and Thum 2012). Sie entstehen durch Fusion von Multivesikularkörperchen (MVBs) mit der Plasmamembran, wodurch sie sich bedeutend von anderen EVs, wie Mikrovesikeln, *apoptotic bodies* oder nekrotischen Bläschen unterscheiden (Raposo and Stoorvogel 2013). Des Weiteren sind sie durch ihre Größe (20-300 nm) sowie ihre biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften, die sie mit internalen Vesikeln von MVBs teilen, von anderen EVs abgrenzbar (van Niel, D'Angelo, and Raposo 2018). Ähnlich wie Zellen, sind Exosomen von einer Lipiddoppelschicht umgeben und beinhalten alle typischen Biomoleküle, einschließlich Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Nukleinsäuren. Damit sind sie hochgradig heterogen und spiegeln den Phänotyp der Zelle wieder, der sie entstammen (Kowal et al. 2016). Durch die mehrfache Einstülpung der Lipidbilayermembran im Rahmen der Biogenese, hat diese die gleiche Orientierung wie die der Zelle, was die Interaktion mit Rezeptoren und Liganden auf Nachbarzellen ermöglicht (Raposo and Stoorvogel 2013). Während einige Zelltypen erst infolge der Induktion Exosomen freisetzen, wie beispielsweise Retikulozyten (Pan et al. 1985), T-Zellen (Blanchard et al. 2002), Mastzellen (Raposo et al. 1997) und ruhende B-Zellen (Saunderson et al. 2008), geben andere Zellen wie Makrophagen (Bhatnagar et al. 2007) und DCs (Zitvogel et al. 1998) Exosomen konstitutiv ab. Exosomen können, basierend auf der Zusammensetzung ihrer Oberflächenmoleküle, immunstimulierende oder immunsupprimierende Effekte hervorrufen. Vorwiegend immunsupprimierende Wirkung zeigen Exosomen, die von Tumorzelllinien freigesetzt werden. Beispielsweise können diese durch den Fas-Liganden oder Galektin 9 Apoptose in T-Zellen induzieren (Andreola et al. 2002), (Klibi et al. 2009). Weiterhin sind sie, durch das Vorhandensein von NKG2D-Liganden und TGF- β , in der Lage, die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zu reduzieren (Liu et al. 2006), (Clayton et al. 2008). Auch Exosomen von Immunzellen können immunsupprimierende Eigenschaften entfalten (Thery, Ostrowski, and Segura 2009). So sekretieren aktivierte T-Zellen Exosomen, die ebenfalls, beruhend auf der FasL/FasR-Interaktion, Apoptose in Bystander T-Zellen induzieren und dadurch am *activation-induced cell death* (AICD) mitwirken (Monleon et al. 2001). Durch die große Vielzahl an Proteinen, mRNAs und

miRNAs, können Exosomen auch eine Reihe an immunstimulatorischen Effekten entfalten (Thery, Ostrowski, and Segura 2009). Entsprechend können Exosomen von B-Zellen in Kombination mit MHCII, direkt CD4⁺ T-Zellen stimulieren. Exosomen von DCs hingegen sind in der Lage, TLR-Liganden zu binden und somit Bystander DCs zu aktivieren. Eine Reihe an Zytokinen in Makrophagen-stämmigen Exosomen, wie CCL3, CCL4, CCL5, TNF- α , G-CSF, CSCL2 und IL-1RA führen bei Zielzellen zur Immunstimulation (McDonald et al. 2014). Außerdem können PAMPs in Exosomen Bakterien-infizierter Zellen verpackt werden und somit die Immunantwort schneller einleiten (McDonald et al. 2014).

Ein besonderes Forschungsinteresse haben in den letzten Jahren DC-stämmige Exosomen, auch Dexosomen (DEX) genannt, geweckt, da sie eine bedeutende Rolle in der Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort spielen (Robbins and Morelli 2014). Dexosomen kennzeichnen sich durch das Vorkommen verschiedener Mitglieder der TNF-Superfamilie auf ihrer Zelloberfläche wie TNF, FasL und Trail. Damit können Dexosomen durch FasL- und Trail-vermittelte Apoptose direkt Tumorzellen töten (Munich et al. 2012). Außerdem sind sie in der Lage, durch direkte Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor von NK-Zellen, die IFN- γ -Sekretion zu induzieren (Reiners et al. 2014). Weiterhin wurde die NK-Zellaktivierung durch Exosomen unreifer humaner DCs durch Liganden für NK-Zell-aktivierende Rezeptoren, wie BAT3, MICA und MICB gezeigt (Simhadri et al. 2008), (Viaud et al. 2009). Da Dexosomen funktionale MHC- und co-stimulatorische Moleküle, wie CD40, CD80 und CD86 exprimieren (Zitvogel et al. 1998), sind sie als potenzielle T-Zellaktivatoren für die Initiation und Amplifikation der Immunantwort entscheidend (Thery, Ostrowski, and Segura 2009). Zum heutigen Zeitpunkt sind drei Modelle zur Antigenpräsentation durch Dexosomen beschrieben. Das erste Modell, das auch als *cross-dressing pattern* bezeichnet wird, geht davon aus, dass DCs vollständige Peptid-MHC-Komplexe von Exosomen aufnehmen und diese direkt CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen präsentieren (Thery et al. 2002), (Segura, Amigorena, and Thery 2005). In einem zweiten Modell, auch *cross-presentation pattern* genannt, wird angenommen, dass Bystander DCs die Exosomen aufnehmen und die von ihnen erhaltenen Proteine/Peptide auf endogenen MHCI- bzw. MHCII-Molekülen präsentieren (Montecalvo et al. 2008). Das dritte Modell beruht auf der direkten Aktivierung von T-Zellen durch Dexosomen (Utsugi-Kobukai et al. 2003), (Admyre et al. 2006).

1.2.6 Funktion von NK Zellen im Immunsystem

NK-Zellen gehören zu den Lymphozyten und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie spielen eine bedeutende Rolle in der frühen Immunantwort gegen unterschiedliche virale und bakterielle Pathogene, einschließlich Chlamydien, und eliminieren infizierte Zellen, Tumorzellen und solche Zellen, die Stresssignale aussenden (Tseng and Rank 1998), (Horowitz, Stegmann, and Riley 2011). Durch ihre vielfältigen Interaktionen mit anderen Zellen des Immunsystems sind sie wichtige Mediatoren zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem (Cooper, Colonna, and Yokoyama 2009). Im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten besitzen NK-Zellen keine Rezeptoren für spezifische Fremdanigene auf der Zelloberfläche. Vielmehr zeichnen sie sich durch die Expression einer Reihe aktivierender und inhibierender Rezeptoren aus (Pegram et al. 2011). Die Rezeptoren liefern Signale, deren Balance letztendlich darüber entscheidet, ob NK-Zellen aktiviert werden oder ob deren Aktivität inhibiert wird (O'Connor, Hart, and Gardiner 2006). Für die Beteiligung an der *first line of defense* müssen NK-Zellen sofort bereit für den möglichen Angriff infizierter oder maligner Zellen sein. Da diese schnelle Antwort eine mögliche Gefahr für gesunde Zellen darstellt, ist der Prozess der NK-Zellaktivierung hochgradig reguliert (Watzl et al. 2014). Die Aktivierung von NK-Zellen kann über drei verschiedene Mechanismen erfolgen. Zwei Hypothesen der NK-Zellaktivierung sind die *missing-self* sowie *induced-self* Theorie (Vivier et al. 2008). Die *missing-self* Theorie geht davon aus, dass inhibierende Rezeptoren (Ly49 bei der Maus, KIR beim Mensch) die Expression von MHC-I-Molekülen „beurteilen“, die von gesunden Zellen konstitutiv exprimiert, jedoch unter zellulärem Stress herunterreguliert werden. Im Gegensatz dazu involviert die *induced-self* Erkennung die Beteiligung verschiedener aktivierender NK-Zell-Rezeptoren durch Proteine, die unter Stressbedingungen exprimiert werden (Vivier et al. 2008). Ein prominenter aktivierender Rezeptor darunter ist NKG2D, der in Stresssituationen, wie viralen Infektionen, durch MICA/MICB aktiviert wird (Lanier 2015). Weitere aktivierende Rezeptoren sind u.a. CD16, NK1.1, NKp46 und 2B4. Außerdem können NK-Zellen durch die Sekretion verschiedener Zytokine, wie IFN-Typ I, IL-12, IL-15, IL-18, durch Antigen-präsentierende Zellen, aktiviert werden (Zwirner and Domaica 2010). Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang DCs, da sie nicht nur bedeutende Zytokine, wie IFN- α/β , IL-12 und IL-15, produzieren, sondern zudem Zellkontakte mit NK-Zellen ausbilden und diese darüber aktivieren können (Ferlazzo and Morandi 2014). Als Resultat der Aktivierung führen NK-Zellen ihre Effektorfunktionen auf unterschiedliche Weise aus. Zur Erkennung und Lyse von Zielzellen bedienen sie sich dabei zweier Mechanismen, der Antikörper-abhängigen zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) sowie der natürlichen Zytotoxizität (Vivier et al. 2008). Für die natürliche Zytotoxizität ist keine vorhergehende Sensibilisierung nötig, wodurch eine schnelle und direkte Erkennung und Abtötung der Zielzelle ermöglicht wird (Topham

and Hewitt 2009). Dabei werden nach Kontakt mit der Zielzelle, sekretorische Granula, die hauptsächlich Granzyme und Perforin enthalten, durch die lytische Synapse transportiert und der zytotoxische Inhalt in den immunologischen Spalt entlassen (Topham and Hewitt 2009). Perforin vermittelt dabei den Eintritt von Granzym in das Zytoplasma der Zielzelle, wo eine Vielzahl an Targets, wie Caspasen, gespalten werden und letztendlich Apoptose induziert wird (Trapani and Smyth 2002). Bei der ADCC werden die Fc-Teile monomerer IgG-Antikörper durch den FcγRIII-Rezeptor (CD16) von NK-Zellen erkannt und gebunden. Für die Aktivierung des Mechanismus muss demnach bereits die Sensibilisierung und klonale Expansion von B-Zellen sowie deren Antikörperproduktion stattgefunden haben (Seidel, Schlegel, and Lang 2013). Sobald der Kontakt zwischen NK-Zelle und der Antikörper-gebundenen Zielzelle zustande kommt, werden neben INF-γ zytotoxische Proteine ausgeschüttet, die wiederum zum Killing der Zielzelle mittels natürlicher Zytotoxizität führen (Topham and Hewitt 2009). Neben der natürlichen Zytotoxizität sind NK-Zellen außerdem in der Lage, Apoptose in Tumorzellen durch Liganden der TNF-Familie, wie FasL, TRAIL und TNF zu induzieren (Warren and Smyth 1999). Infolge der Aktivierung sekretieren NK-Zellen im Gegenzug ebenfalls Zytokine (INF-γ, TNF-α, GM-CSF) und Chemokine (CCL-3 -L4, -L5), die zum Killing der Zielzellen führen (Robertson 2002). Eine besondere Rolle spielt dabei INF-γ, da es maßgebend zur Kontrolle malignen Wachstums führt. Des Weiteren steigert INF-γ die Expression von MHC-I-Molekülen oder seiner Varianten ULBP und MICA/MICB auf Tumorzellen und fördert damit deren Erkennung (Parker, Rautela, and Hertzog 2016). Durch INF-γ wird außerdem die Differenzierung von T-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen induziert und folglich die T-Zellantwort amplifiziert (Belardelli 1995).

1.2.7 Immunbiologie einer Chlamydieninfektion

Die erfolgreiche Bekämpfung einer Chlamydieninfektion setzt ein effizientes Zusammenspiel des angeborenen und adaptiven Immunsystems voraus. Infizierte Epithelzellen, die chlamydiale Strukturen über PRRs erkennen, sekretieren u.a. die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und GM-CSF sowie die Chemokine CCL-5, CCL-7 und CXCL-10 (Johnson 2004), (Maxion and Kelly 2002), (Rasmussen et al. 1997). Dadurch werden verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems zum Infektionsherd rekrutiert (Knittler et al. 2014). Eine der ersten Zelltypen, die am Infektionsort nachgewiesen werden können, sind DCs (Vasilevsky et al. 2014). Chlamydien-infizierte DCs exprimieren den Chemokinrezeptor CCR-7 auf der Oberfläche, welcher ihnen die Migration in lymphatische Organe ermöglicht (Cyster 1999). Dort angelangt, präsentieren sie die prozessierten Peptidantigene T-Lymphozyten, die durch das, von ihnen sekretierte IL-12 von CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Helferzellen differenzieren (Chen et al. 2013). NK-Zellen und Neutrophile zählen ebenfalls zu den

ersten Zellen, die am Infektionsort zu finden sind und spielen eine bedeutende Rolle in der initialen Kontrolle einer Chlamydieninfektion (Vasilevsky et al. 2014). Neutrophile scheinen zwar nicht essentiell für die Klärung der Infektion benötigt zu werden, führen vermutlich jedoch zur Reduktion der initialen Chlamydieninfektion und schränken somit die Verbreitung der Infektion ein (Barteneva et al. 1996). NK-Zellen tauchen ebenfalls bereits 12-24 Stunden nach der Infektion am Infektionsort auf (Tseng and Rank 1998) und werden durch IL-12 von Seiten infizierter DCs und IL-18, welches von infizierten Epithelzellen sekretiert wird, zur IFN- γ Produktion angeregt (Hook, Matyszak, and Gaston 2005). IFN- γ , welches sowohl von NK-Zellen, als auch aktivierten CD4⁺ T-Zellen sekretiert wird, spielt sowohl eine bedeutende Rolle für die Inhibition des Chlamydienwachstums, als auch für die Induktion einer Th1-Immunantwort (Vasilevsky et al. 2014). IFN- γ kann durch unterschiedliche Mechanismen das Überleben der Pathogene beeinflussen, indem es beispielsweise die phagozytotische Aktivität von Makrophagen erhöht und somit die Aufnahme und Eliminierung von Chlamydien fördert (Zhong and de la Maza 1988). Des Weiteren führt IFN- γ zur Herunterregulation des Transferrin-Rezeptors und damit zur Verhinderung des Transports von Eisen in die Zelle, welches für das chlamydiale Überleben benötigt wird (Roan and Starnbach 2008). Außerdem wird durch die IFN- γ -vermittelte Induktion der IDO-Expression in infizierten Zellen und der damit einhergehenden Depletion von Tryptophan, einer für Chlamydien essentiellen Aminosäure, das Chlamydienwachstum inhibiert (Paguirigan et al. 1994). Weiterhin aktiviert IFN- γ in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Verbindungen, die zur Abtötung der phagozytierten Chlamydien führen (Ramsey et al. 2001). Die Th1-Immunantwort wird von NK-Zellen vermutlich durch Modulation der DC-Funktion beeinflusst. Das von NK-Zellen sekretierte IFN- γ scheint dabei DCs so zu modulieren, dass sie die Th2-Antwort herunterregulieren, was die Expression einer starken Th1-vermittelten Immunität zur Folge hat (Vasilevsky et al. 2014). Neben der Produktion von Zytokinen sind Th1-Zellen wichtig für eine Antikörper-vermittelte B-Zellantwort. Chlamydien-spezifische Antikörper scheinen dabei insbesondere für den Schutz gegen Reinfektionen von Bedeutung zu sein (Igiertseme et al. 2004), (Moore et al. 2002), (Morrison et al. 2000). Neben CD4⁺ T-Zellen tauchen außerdem CD8⁺ T-Zellen am Infektionsort auf. Beide T-Zelltypen erkennen *C. trachomatis* Antigene, einschließlich OMP2, POMP-D, MOMP, HSP60 und CPAF (Vasilevsky et al. 2014). Für CD8⁺ T-Zellen konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass sie spezifisch Chlamydien-infizierte Fibroblasten lysieren können (Wizel et al. 2008). Außerdem weisen einige Studien auf die IFN- γ -Sekretion von CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung hin (Starnbach et al. 2003). Des Weiteren führt der *Knockout* von TAP-1 oder β 2-Mikroglobulin, welche beide essentiell für die Antigenpräsentation über MHCI-Moleküle sind, zu einer deutlicheren Anfälligkeit für *C. pneumoniae*-Infektionen (Rottenberg et al. 1999). Folglich scheinen beide T-Zelltypen zu einer schützenden Immunität im Rahmen der Chlamydieninfektion beizutragen (Nogueira et al. 2015). Weiterhin spielt das

Komplementsystem eine Rolle in der anti-chlamydialen Immunität (Dutow et al. 2014). So wurde in *C. psittaci*-infizierten Mäusen eine ausgeprägte und anhaltende Komplementaktivierung beobachtet (Bode et al. 2012). Die Abwehrfunktion des Komplements gegenüber *C. psittaci* beruht auf C3a (Anaphylatoxin) sowie dem korrespondierenden Rezeptor (C3aR). Studien an C3aR^{-/-} Mäusen belegen, dass C3aR für die Reduktion der Mortalität während der *C. psittaci*-Infektion verantwortlich ist (Dutow et al. 2014). Dies deutet darauf hin, dass das Komplement durch EBs aktiviert wird, was letztlich zur Entstehung von C3a und b durch Spaltung des ursprünglichen C3-Faktors führt. C3a kann dann über seinen entsprechenden Rezeptor die Funktion von T-Zellen (Strainic et al. 2008), (Werfel et al. 2000), (Kwan et al. 2013) modulieren, um eine erfolgreiche adaptive Immunantwort aufzubauen. Zusätzlich kann die Aktivierung von DCs über C3a/C3aR ihre Migration zu den Lymphknoten für die nachfolgende Antigenpräsentation erleichtern (Li et al. 2008), (Peng et al. 2008).

1.3 Autophagie

1.3.1 Funktion und Induktion der Autophagie

Bei Autophagie (von altgriechisch αὐτόφαγος autóphagos „sich selbst verzehrend“ und κύτος kýtos „Höhlung, Raum“) handelt es sich um einen, unter Eukaryoten evolutionär hoch konservierten Mechanismus, der durch die Degradation von Proteinaggregaten und geschädigten Organellen, der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dient (Cuervo et al. 2005) (Abb. 1-3). Autophagie kann durch verschiedene Bedingungen induziert werden, wie z.B. Nährstoffmangel, Sauerstoffmangel, oxidativen Stress oder Strahlung (Levine, Mizushima, and Virgin 2011), (Yang and Klionsky 2010). Durch den Abbau von Proteinen und anderen Makromolekülen werden bei Nährstoffmangel essentielle anabolische Nährstoffe geliefert (Cuervo and Macian 2012). Folglich spielt Autophagie eine essentielle Rolle für das Überleben der Zelle in Stresssituationen, indem sie geschädigte zelluläre Komponenten abbaut, die andernfalls zytotoxisch wären und gleichzeitig die Homöostase der Zelle aufrechterhält (Mizushima and Komatsu 2011), (Ravikumar et al. 2010) (Abb. 1-3). Autophagie kann in drei Typen unterteilt werden: die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA), Mikroautophagie und Makroautophagie. Letztere kann sowohl selektiv, als auch nicht selektiv erfolgen (Reggiori et al. 2012). Während der nicht selektiven Autophagie wird eine zufällige Portion des Zytoplasmas, z.B. als Antwort auf Aminosäuremangel, aufgenommen (Mizushima 2007). Die selektive Autophagie hingegen zeichnet sich durch die spezifische Aufnahme und Degradation von Organellen, wie beispielsweise Mitochondrien (Lemasters 2005) und Peroxisomen (Iwata et al. 2006) (Mitophagie bzw. Pexophagie) oder Proteinaggregaten (Aggrephagie) (Bjorkoy et al. 2005) aus und umfasst

außerdem den spezifischen Abbau von Mikroorganismen mittels Xenophagie (Levine 2005). Ein charakteristisches Merkmal der Makroautophagie (im Folgenden als Autophagie bezeichnet) ist die Ausbildung eines Doppelmembran-umschlossenen Kompartiments, auch Autophagosom genannt (Abb. 1-3), in welches die zytoplasmatischen Strukturen aufgenommen und im Folgenden degradiert werden (Bento et al. 2016). Der autophagosomale Prozess wird dabei initiiert durch die Bildung einer Isolationsmembran (Abb. 1-3), auch Phagophore genannt (Mizushima and Komatsu 2011). Diese hat ihren Ursprung typischerweise im Endoplasmatischen Retikulum (Hayashi-Nishino et al. 2009), kann jedoch auch von Membranen des Golgi-Apparates (Geng and Klionsky 2010), Mitochondrien (Hailey et al. 2010) oder der Plasmamembran stammen (Lamb, Yoshimori, and Tooze 2013). Die Phagophore vergrößert sich, nimmt Teile des Zytoplasmas auf und bildet, durch Schluss der Doppelmembran, das reife Autophagosom (Abb. 1-3). Letztendlich fusionieren reife Autophagosomen mit Lysosomen, um Autolysosomen zu bilden, in denen der aufgenommene Inhalt sowie die innere Autophagosomenmembran mithilfe verschiedener lysosomaler Enzyme, wie Hydrolasen, degradiert wird (Fujita et al. 2008), (Mizushima et al. 2001) (Abb. 1-3).

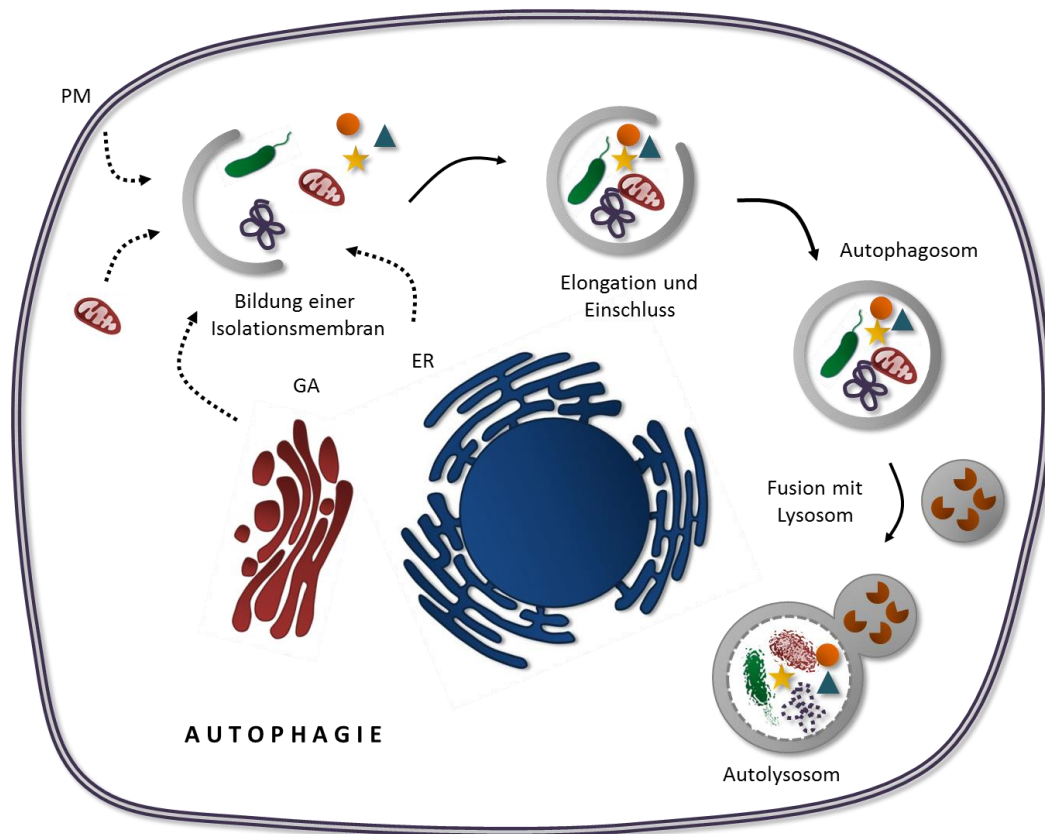


Abb. 1-3 Genereller Mechanismus der Autophagie (Radomski, Rebbig, et al. 2017)

Nach Initiation der Autophagie bildet sich eine Isolationsmembran, auch Phagophore genannt. Die dafür erforderlichen Membranen stammen typischerweise vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Golgi-Apparat (GA), können jedoch auch von Mitochondrien oder der Plasmamembran (PM) geliefert werden. Im Folgenden verlängert sich die Phagophore und schließt das abzubauen Material ein. Bei letzterem kann es sich um Teile des Zytoplasmas, verschiedene Organellen, eindringende Pathogene oder aggregierte Proteine handeln. Letztendlich entsteht durch Schluss der Doppelmembran das reife Autophagosom. Dieses fusioniert anschließend mit Lysosomen, auch Autolysosomen genannt, in denen der Abbau des aufgenommenen Materials erfolgt.

Für den komplexen Autophagieprozess ist die koordinierte Beteiligung von *autophagy related genes* (ATGs) essentiell erforderlich (Meijer et al. 2007). Eine wichtige Komponente stellt dabei der ULK1-Komplex dar, der die Bildung der Phagophore kontrolliert und aktiviert wird, wenn die zentrale Komponente der Autophagie mTOR inaktiv ist (Mizushima 2010). ULK1 aktiviert Beclin-1, welches wiederum zusammen mit weiteren ATG-Proteinen den Phosphatidylinositol-3-Kinasekomplex bildet (Russell et al. 2013). Dieser ist für die Markierung des Entstehungsorts von Autophagosomen von Bedeutung. Durch die Transmembranproteine ATG9 und VMP1 erfolgt die Rekrutierung von Membranen zu dem entstehenden Autophagosom (Kroemer, Marino, and Levine 2010). Zwei Ubiquitinsysteme vermitteln zudem die Vergrößerung sowie vollständige Reifung der Phagophore: I) das ATG12-ATG5 Konjugat und II) das LC3-PE Konjugat (Mizushima et al. 2003). Im Gegensatz zur nicht selektiven Autophagie benötigt die selektive Autophagie einen weiteren Schritt- die Auswahl

der „Fracht“- was durch Autophagierezeptoren und Adapterproteine vermittelt wird (Johansen and Lamark 2011).

1.3.2 Xenophagie – Komponenten und Mechanismen

Xenophagie (von griechisch ξένος (xénos) „Fremder“ und φαγεῖν (phageîn) „fressen“) beschreibt die Eliminierung eindringender Pathogene durch selektive Autophagie (Levine 2005). Basierend auf der Beobachtung der Autophagosomenbildung in *Rickettsia conorii*-infizierten polymorphkernigen Zellen im Jahr 1984 wurde erstmalig vermutet, dass es sich bei Autophagie auch um einen Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene handeln könnte (Rikihisa 1984). Seitdem und insbesondere im Laufe der letzten Jahre kristallisierte sich heraus, dass Autophagie als zellautonomer Immunmechanismus gegen bakterielle Infektionen agiert. Dabei können sowohl zytosolische Bakterien sowie Bakterien innerhalb zerstörter Vakuolen, erkannt und mittels Xenophagie degradiert werden (Knodler and Celli 2011). Das Schlüsselereignis, das Xenophagie auslöst, ist die Ubiquitinierung. Ubiquitinierung wird vermittelt durch E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym), E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) und E3 (Ubiquitin-Ligase) (Callis 2014). Die prominentesten E3-Ubiquitinligasen, die im Zusammenhang mit Xenophagie stehen, sind LRSAM1 und Parkin (Randow and Youle 2014). LRSAM1 erkennt und ubiquitiniert autophagosomale Proteine während der Salmonelleninfektion und vermittelt zudem die Rekrutierung des Adapterproteins NDP52 (Huett et al. 2012). Für Parkin ist neben der Ubiquitinierung PINK-1-assoziiierter defekter Mitochondrien im Rahmen der Mitophagie außerdem eine Rolle in der Ubiquitinierung von *S. typhimurium* und *M. tuberculosis* gezeigt worden (Manzanillo et al. 2013). Der xenophagosomale Abbau ubiquitinierten bakterieller Strukturen setzt die Erkennung eindringender Pathogene durch Autophagierezeptoren und Adapterproteine und ihre Zufuhr zu autophagosomalen Kompartimenten voraus (Johansen and Lamark 2011). Bisher wurden die drei xenophagosomalen Adapterproteine p62, NDP52 und Optineurin identifiziert. Diese teilen drei konservierte Eigenschaften, die für eine effiziente selektive Autophagie benötigt werden: I) Die Interaktion mit den Autophagiemodifizierern LC3/GABARAP durch ihre LC3-interagierende Region (LIR), II) die Fähigkeit zu polymerisieren/aggregieren und III) die spezifische Substraterkennung (Johansen and Lamark 2011). Damit sind sie in der Lage, ubiquitinierte bakterielle Strukturen zu binden und diese LC3-positiven Membranen zuzuführen. Optineurin und NDP52 agieren in Assoziation mit p62 (auch bekannt als Sequestosom-1) als Xenophagie-Rezeptoren (Knodler and Celli 2011). Das zentrale Adapterprotein p62 erkennt polyubiquitinierte zytosolische Bakterien, wie *Salmonella typhimurium* oder *L. monocytogenes* und vermittelt somit die Aufnahme der Pathogene in LC3-positive Phagophoren. Optineurin und NDP52 können sowohl Ubiquitin-

abhängig, als auch -unabhängig Autophagie vermitteln (Johansen and Lamark 2011). Beispielsweise erkennt NDP52 ubiquitinierte Salmonellen im Zytosol und führt sie dem Abbau zu. Es ist jedoch auch in der Lage, den Galektin-8-Rezeptor, der an zerstörte Salmonellen Vakuolen bindet, zu erkennen und LC3 dorthin zu rekrutieren (Huang and Brumell 2014). Über die beteiligten polyubiquitinierten bakteriellen und Wirtszell-Proteine liegen bis heute nur sehr wenige Kenntnisse vor.

1.3.3 Xenophagie im Immunsystem

Wie bereits erwähnt, agiert Xenophagie als zellautonomer Immunmechanismus gegen mikrobielle Infektionen (Levine 2005). Für eine Vielzahl an PRRs, insbesondere TLRs, konnte eine Rolle in der Xenophagieinduktion gezeigt werden (Into et al. 2012). So führt die Erkennung von pathogenen Mikroorganismen auf der Zelloberfläche durch TLR-1, TLR-2, TLR-4 und TLR-6 und in Endosomen durch TLR-3 und TLR-7 zur Einleitung der Xenophagie (Delgado and Deretic 2009). Neben TLRs ist außerdem eine zweite Klasse an PRRs an der Induktion der Xenophagie beteiligt- die *NOD-like receptors* (NLRs) (Murray 2005). Dabei wird ATG16L1 durch NOD1 und NOD2 an die Eintrittsstelle zytosolischer Bakterien, wie beispielsweise *Shigella flexneri* und *Listeria monocytogenes*, rekrutiert und die Pathogene letztendlich mittels Xenophagie abgebaut (Travassos et al. 2010). Xenophagie ist außerdem unter der Kontrolle verschiedener Zytokine sowie immunologisch relevanter Zelloberflächenrezeptoren (Puleston and Simon 2014). Ein prominenter Induktor der Xenophagie ist dabei das Th1-Zytokin IFN- γ . Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 hingegen üben inhibitorische Effekte auf die Xenophagie aus, was annehmen lässt, dass Xenophagie eine Rolle als Effektorarm der Th1-vermittelten Immunität spielt (Deretic 2010). Neben der direkten Eliminierung von Mikroorganismen spielt Xenophagie durch die Generierung von Peptidantigenen eine wichtige Rolle für die MHCI- und MHCII-vermittelte Antigenpräsentation (Crotzer and Blum 2009), (Munz 2010). Xenophagie liefert zytoplasmatische Komponenten für die lysosomale Hydrolyse und trägt somit zur Prozessierung endogener Antigene für die MHCII-Präsentation bei (Romao, Gannage, and Munz 2013). Dies wurde zunächst für ein prominentes Antigen des Epstein-Barr Virus entdeckt, welches von CD4⁺ T-Zellen erkannt wurde (Paludan et al. 2005). Weitere Studien konnten zudem zeigen, dass Rapamycin-induzierte Auto-/Xenophagie die Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHCII-Molekülen erhöht (Jagannath et al. 2009), (Schmid, Pypaert, and Munz 2007). Xenophagie scheint zudem an der Beladung von Antigenen auf MHCI-Moleküle beteiligt zu sein (Chemali et al. 2011). Für die Herpesviren Herpes Simplex Virus Typ 1 und das humane Cytomegalovirus konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es trotz Inhibition des TAP-Komplexes im Rahmen der Infektion zu einer Xenophagie-vermittelten, Proteasom- und TAP-unabhängigen MHCI-Präsentation viraler

Peptidantigene in DCs kommt (English et al. 2009), (Tey and Khanna 2012). Des Weiteren wird angenommen, dass Autophagie, vermittelt durch IFN- γ , die Hochregulation von MHCI-Molekülen unterstützt (Li et al. 2010). Somit scheint Xenophagie an der Lieferung intrazellulärer Antigene zu vesikulären MHCI-Ladekompartimenten beteiligt zu sein sowie an der Prozessierung extrazellulärer Antigene für die Präsentation durch MHCI, auch Kreuzpräsentation genannt (Das, Kaveri, and Bayry 2015). Für die Infektion mit verschiedenen Mikroorganismen, wie dem respiratorischen Synzytial-Virus sowie verschiedenen Chlamydien- und Aspergillus-Spezies, konnte gezeigt werden, dass die Xenophagie-Maschinerie die Kreuzpräsentation von Antigenen begünstigt (Johnstone et al. 2012), (Blanchet et al. 2010), (Fiegl et al. 2013), (De Luca et al. 2012). Einige Viren, wie HIV, Polio und Epstein-Barr Virus nutzen Autophagiemembranen für den Austritt aus der Zelle mittels Exozytose, was ebenfalls die Antigenpräsentation zu fördern scheint (Kyei et al. 2009), (Jackson et al. 2005), (Nowag et al. 2014). Für Tumorantigene und Antigene des Influenza A Virus konnte gezeigt werden, dass durch die autophagosomale Exozytose die Kreuzpräsentation vermittelt wird (Uhl et al. 2009). Die Arbeiten unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigen erstmalig einen neuen, bisher unbekannten MHCI-Kreuzpräsentationsweg, der über die intrazelluläre Zerstörung parasitophorer Vakuolen und anschließende Xenophagie freigesetzter zytosolischer Chlamydien zur amphisomalen Antigenprozessierung und MHCI-Beladung führt (Fiegl et al. 2013). Die bisherigen Untersuchungen belegen, dass durch die strukturelle Auflösung der Inklusionsmembran die freigesetzten Chlamydien von amphisomalen Strukturen (Fusionen aus Autophagosomen und Endosomen) reifender DCs aufgenommen werden, in denen die Generierung bakterieller Antigene durch endo-/lysosomale Proteasen (Cathepsine) startet (Fiegl et al. 2013). Durch ein intrazelluläres Zusammenspiel von xenophagosomalen Prozessen und Kreuzpräsentationswegen gelangen Peptidantigene letztlich auf MHCI-Moleküle, die von amphisomalen Vakuolen zur Zelloberfläche transportiert werden und so die entsprechenden Chlamydien-spezifischen CTLs für eine Immunantwort aktivieren (Fiegl et al. 2013). Weitergehende Forschungsarbeiten unseres Labors ergaben zudem, dass auch Epithelzellen, welche ein Hauptinfektionsziel von Chlamydien darstellen, unter dem Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen, Xenophagie als Mechanismus anti-chlamydialer Zellabwehr nutzen (Fiegl et al. 2013). Dieser Mechanismus erinnert an die Funktion von MHCII-Molekülen bei der autophagosomalen Prozessierung in APCs (Schmid, Pypaert, and Munz 2007). Es ist daher anzunehmen, dass Xenophagie von Chlamydien einen wichtigen Weg in der Generierung von chlamydialen Peptidantigenen darstellt, die CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden (Fiegl et al. 2013). Die autophagosomale Antigenverarbeitung infizierter DCs hat den Vorteil, dass Polypeptide vakuolarer Pathogene, wie Chlamydien, die normalerweise einen direkten Kontakt zum Zytosol sowie zu Lysosomen der Wirtszelle vermeiden, für die Antigenpräsentation und das T-Zell-Priming prozessiert werden können (Jiang et al. 2008).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

DCs gehören zu den ersten professionellen APCs, auf die Chlamydien während der Infektion des Wirtsorganismus treffen. Sie sind mit speziellen zellulären Mechanismen ausgestattet, die eine Präsentation von MHC-Antigen-Komplexen optimieren und sie so zu effektiven Initiatoren und Stimulatoren der zellulären Immunantwort machen. Infizierten DCs und den von ihnen aktivierten T-Zellen, kann auf Grundlage bisheriger Forschungsdaten eine zentrale Aufgabe in der anti-chlamydialen Immunantwort zugeschrieben werden. Trotz dieser Bedeutung sind die Abläufe und Prozesse, durch die Chlamydien innerhalb infizierter DCs bekämpft und für die MHCI-Präsentation verarbeitet werden, noch weitestgehend unbekannt.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gelang, unter Verwendung immortalisierter muriner DCs sowie dem nicht-aviären Erreger *C. psittaci* (DC15), die Identifizierung einer zellautonomen Abwehr infizierter DCs gegen Chlamydien (Danny Kägebein, Dissertation, Dorothee Fiegl, Dissertation). Diese charakterisiert sich durch die strukturelle Desintegration von Inklusionen, deren Zuführung in den Auto-/Xenophagieweg sowie die nachgeschaltete vakuolare Generierung von MHCI-präsentierten Antigenen. Darüber hinaus wiesen erste Voruntersuchungen unseres Labors (Danny Kägebein, Dissertation) darauf hin, dass bei dieser zellulären Selbstverteidigung der DCs gegen Chlamydien die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2) sowie die von ihr freigesetzte Arachidonsäure eine Schlüsselfunktion aufweisen. Ausgehend davon wurde postuliert, dass cPLA2/Arachidonsäure sowie auto-/xenophagosomale Abbaumechanismen eine entscheidende Rolle in der anti-chlamydialen Abwehr von DCs spielen. Die genauen zellulären Prozesse und biochemischen Abläufe der Desintegration und der nachgeschalteten Xenophagie chlamydialer Kompartimente sind bisher jedoch noch nicht verstanden. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen sollte daher der auto-/xenophagosomale Mechanismus der intrazellulären Chlamydienbekämpfung sowie die daran beteiligten Komponenten im Detail untersucht werden.

Der Prozess der Auto-/Xenophagie steht, durch die Entstehungsweise autophagosomaler Kompartimente, in einem engen strukturellen und funktionellen Zusammenhang mit Multivesikularkörperchen (MVBs) sowie mit den von ihnen freigesetzten Exosomen. Insbesondere für DC-stämmige Exosomen (Dexosomen) konnte in den letzten Jahren eine entscheidende Rolle für die interzelluläre Kommunikation (wie z.B. mit NK-Zellen) und Verstärkung der Immunantwort gezeigt werden. Ein weiteres Ziel dieser Promotionsarbeit war es daher zu untersuchen, ob es bei DCs infektionsbedingt zu einer vermehrten Freisetzung von Dexosomen kommt und welche Bedeutung und Funktion diese extrazellulären Membranvesikel in der anti-chlamydialen Immunität haben.

Einleitung

Letztlich sollte im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit auch geklärt werden, ob NK-Zellen, die ebenfalls an der frühen Immunabwehr einer Chlamdieninfektion beteiligt sind und zudem in enger wechselseitiger Interaktion mit DCs stehen, mit Chlamydien infizierbar sind. In Abhängigkeit der generierten Ergebnisse sollte ferner analysiert werden, ob und in welchem Maße infizierte NK-Zellen Abwehrmechanismen besitzen, die intrazelluläre Chlamydien in zellautonomer Weise bekämpfen. Die Untersuchungen dieser Arbeit ermöglichen ein tieferes Verständnis der Wirts-Pathogen-Interaktionen Chlamydien-infizierter DCs sowie der funktionalen Wechselwirkung von DCs, NK- und T-Zellen während der anti-chlamydialen Immunantwort.

2 Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 2.1 Verwendete Chlamydienstämme

Chlamydienstämme	Herkunft
nicht-aviärer <i>Chlamydia psittaci</i> DC15 (S2)	Friedrich-Loeffler-Institut Jena
<i>Chlamydia trachomatis</i> LGV2 (S2)	Institut für Mikrobiologie, Universität Würzburg

2.1.2 Zelllinien

Tab. 2.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
BGM (Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze)	Friedrich-Loeffler-Institut Jena
JAWSII (murine dendritische Zellen)	ATCC CRL-11904
KG-1 (humane myeloide Leukämiezellen)	DSMZ, ACC14
KY-2 (muriner NK-Zellklon)	Dr. W. Yokoyama, St. Louis
MN-R (murine Nierenepithelzellen)	Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV) CCLV RIE 282
RMA-S (murine T-Zell Lymphomzellen)	Friedrich-Loeffler-Institut Riems
YAC-1 (murine T-Zell Lymphomzellen)	Friedrich-Loeffler-Institut Riems

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Herkunft
2-Hydroperoxy-2-methylpropan (TBHP)	Life Technologies, USA
5x PCR Mastermix	BioCell, USA
Aceton	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bleiacetat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Carbonylcyanid 3-chlorophenylhydrazon (CCCP)	Abcam, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DAPI	Cell Signaling, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie/Reagenz	Herkunft
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycidether 100	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
IFN- γ	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IGEPAL (NP-40)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ionomycin	InvivoGen, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kohrsolin	Thermo Scientific, England
L-Glutaminsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lysotracker	CellSignaling, USA
MassRuler (DNA Ladder)	ThermoScientific, Litauen
Milchpulver	Heirler-Cenovis, Radolfzell, Deutschland
Mitotracker	CellSignaling, USA
N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcacodylat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcacodylat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Deoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Nuclease free water	Promega, USA
Osmiumtetroxid	Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschl.
PageRulerTM (Protein Ladder)	ThermoScientific, Litauen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenolrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	InvivoGen, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20)	BDH Laboratory Supplies, UK
Ponceau S Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propylenoxid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Rapamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
rmTNF- α	R&D, MN, USA
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sucrose	Serva, Heidelberg, Deutschland

Chemikalie/Reagenz	Herkunft
t-Octoylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trizol (peqGold TriFast)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Uranylacetat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.3 Medien und Medienzusätze

Tab. 2.4 Verwendete Medien und Medienzusätze

Medium/Mediumzusatz	Herkunft
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dialysiertes fetales Kälberserum	Silantes, München, Deutschland
fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
GM-CSF, murin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IL-2, murin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Tab. 2.5 Verwendete Primärantikörper

Protein	Herkunft	Anwendung	Herkunft
acetyl. α-Tubulin	Maus, Mono	IF, 1:2000, WB, 1:1000	Sigma-Aldrich, Dtl.
Bcl-2	Kaninchen, Mono	WB, 1:1000	Cell Signaling, USA
Beclin-1	Kaninchen, Poly	IF, 1:200	Abcam, GB
Caspase 3	Kaninchen, Poly	WB, 1:1000	Cell Signaling, USA
Caspase 8	Kaninchen, Poly	WB, 1:1000	Cell Signaling, USA
NKG2D (Biotin)	amer. Hamster, Mono	FACS, 1:100	Biolegend, USA
CD9	Kaninchen, Mono	WB, 1:2000	Abcam, GB
Chlamydia BDI168	Maus, Mono	IF, 1:50	Abcam, GB
Chlamydia LSC 125098	Maus, Mono	IF, 1:500	LS Bio, USA
Chlamydia trachomatis	Kaninchen, Poly	IF, 1:500	Abcam, GB
chlamydiales Hsp60	Maus, Mono	WB, 1:1000	Acris Antibodies
chlamydiales LPS	Maus, Mono	WB, 1:200	Abcam, GB
COPI	Kaninchen, Poly	IF, 1:250	Novusbio, USA
cPLA2	Kaninchen, Poly	IF, 1:200, WB, 1:1000	Cell Signaling, USA
Fas-Ligand (CD95-L)	Ratte, Mono	WB, 1:2500	GeneTex, GB
Fas-Rezeptor (CD95)	Kaninchen, Poly	WB, 1:1000	Abcam, GB

Protein	Herkunft	Anwendung	Herkunft
Fas-Rezeptor (PE)	Hamster, Mono	FACS, 1:50	BD Pharmingen, USA
GAPDH	Maus, Mono	WB, 1:1000	Millipore, USA
Giantin	Kaninchen, Poly	IF, 1:1000	Abcam, GB
Granzym-B	Kaninchen, Poly	WB, 1:1000	Cell Signaling, USA
H-2Kb (PE)	Maus, Mono	FACS, 1:50	BD Pharmingen, USA
HDAC6	Kaninchen, Poly	IF, 1:200, WB, 1:500	antikoerper.online
HDAC6	Kaninchen, Poly	WB, 1:1000	Thermo Scientific
HSP25/27	Kaninchen, Poly	IF, 1:200	Abcam, GB
IFN- γ (PE)	Ratte, Mono	FACS, 4 μ l/Test	eBioscience , Österr.
LAMP-1	Kaninchen, Mono	IF, 1:1000	Abcam, GB
LC-3 A/B	Kaninchen, Poly	IF, 1:100	Abgent, USA
LRSAM-1	Kaninchen, Poly	IF, 1:200, WB, 1:500	Bioss, USA
p62	Maus, Mono	IF, 1:200	Abcam, GB
Parkin	Kaninchen, Poly	IF, 1:200, WB, 1:1000	Abcam, GB
Perforin	Kaninchen, Poly	IF, 1:200, WB: 1:1000	Abcam, GB
Perforin (Alexa647)	Ratte, Mono	FACS, 2,5 μ l/Test, pur	eBioscience , Österr.
PINK-1	Kaninchen, Poly	IF, 1:400	Abcam, GB
TNFR-1	Kaninchen, Mono	WB, 1:1000	Cell Signaling, USA
TNF- α	Kaninchen, Mono	WB, 1:1000	Cell Signaling, USA
Vimentin	Maus, Mono	IF, 1:200, WB, 1:500	Abcam, GB
β -Aktin	Kaninchen, Poly	WB, 1:10000	Sigma-Aldrich, Dtl.
β -Aktin (HRP)	Maus, Mono	WB, 1:70000	Sigma-Aldrich, Dtl.
β -Tubulin	Maus, Mono	IF, 1:1000, WB, 1:1000	Sigma-Aldrich, Dtl.
γ -Tubulin	Maus, Mono	IF, 1:500, WB, 1:1000	Sigma-Aldrich, Dtl.
H-2Kb	Maus, Mono	FACS, IF 1:200	Hybridoma-Zelllinie Y3
NK1.1 (Biotin)	Maus, Mono	FACS, 1:50	eBioscience , Österr.
3.B10.7 (MHCI, schwere Kette)	Ratte, Mono	WB, 1:500	P. Cresswell, Yale University, USA

2.4.2 Sekundärantikörper

Tab. 2.6 Verwendete Sekundärantikörper

Protein	Konjugation	Anwendung	Herkunft
IgG (H+L) Kaninchen	HRP	WB: 1:2000	Dianova, Dtl.
IgG (H+L) Kaninchen	Alexa594	IF: 1:500	CellSignaling, USA
IgG (H+L) Kaninchen	Alexa488	IF: 1:500	Cell Signaling, USA
IgG (H+L) Maus	HRP	WB: 1:2000	Dianova, Dtl.
IgG (H+L) Maus	Alexa594	IF: 1:500	Cell Signaling, USA
IgG (H+L) Maus	Alexa488	IF: 1:500	Cell Signaling, USA
IgG (H+L) Maus	PE	IF: 1:200	Cell Signaling, USA
IgG (H+L) Maus	FITC	FACS: 1:200	Cell Signaling, USA
IgG (H+L) Ratte	HRP	WB: 1:2000	Dianova, Dtl.
IgG (H+L) Ratte	FITC	FACS: 1:200	Cell Signaling, USA
IgG (H+L) Ratte	PE	IF: 1:500	Cell Signaling, USA
IgG1 Maus	HRP	WB: 1:2000	Thermo Fisher, USA
IgG2a Maus	HRP	WB: 1:2000	Thermo Fisher, USA
IgG2b Maus	HRP	WB: 1:2000	Thermo Fisher, USA
IgG2c Maus	HRP	WB: 1:2000	Thermo Fisher, USA
IgG3 Maus	HRP	WB: 1:2000	Thermo Fisher, USA

2.5 Inhibitoren

Tab. 2.7 Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Mechanismus	Herkunft
Exo-1	vesikulärer Transport ER/GA	Abcam, USA
Exo-2	vesikulärer Transport ER/GA	Santa Cruz, USA
MG-132	Proteasom	Abcam, USA
PP2	Scr und RIP2 Kinase	Abcam, USA
Rapamycin	mTor	Sigma-Aldrich, Dtl.
Tubacin	HDAC6	Enzo Life Sciences, Dtl.
U73122	Phospholipase C	Abcam, USA
Vacuolin-1	Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran	Merck, Darmstadt, Dtl.

2.6 Primersequenzen

Alle in der folgenden Tabelle aufgelisteten Primerpaare wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

Tab. 2.8 Verwendete Primersequenzen

Gen	Sequenz
Mykoplasmen-Test	Forward 5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCA-3' Reverse 5'-GGTCTGAGGATGCCCTCCGT-3'
GAPDH	Forward 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3' Reverse 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'
gyrA1	Forward 5'-GCTTTGCCTGATGCTAGGGA-3' Reverse 5'-ACAAGAGGGTATCGCATGGC-3'
gyrA2	Forward 5'-ATCGCGGAAGTGTGTTGGTGTT-3' Reverse 5'-TGTGTGGCTCGTCCCATTAC-3'
sctN1	Forward 5'-ACGGGATGGAGCCTCTAGTT-3' Reverse 5'-TAACCTTCTCCTGCTCGGA-3'
sctN2	Forward 5'-TTGCCGGACGTGCAATTAAC-3' Reverse 5'-CTCCATCCCGTGACGTTTCA-3'
ftsW1	Forward 5'-CAAAGCTCTGATCCGGCAGA-3' Reverse 5'-AGCCAACGCTTAGCTCCATT-3'
ftsW2	Forward 5'-AAGCTCTGATCCGGCAGATT-3' Reverse 5'-CAGCCAACGCTTAGCTCCAT-3'
groEL1	Forward 5'-TCATTCCGGTGAAGCAGGAC-3' Reverse 5'-GGCACGCGGTCTGTAAAATC-3'
groEL2	Forward 5'-CCTCGCCGCCTTTCTCTAAT-3' Reverse 5'-GTCCTGCTTACCAGGAATGA-3'
CD146	Forward 5'-TCA CAG TCA GTC CTC ACA CCA G-3' Reverse 5'-CCA TCT CTT CTG GGA GCT TAT CTG-3' (lange Isoform) Reverse 5'-CAG ATC GAT GTA TTT CTC TCC ATC TC-3' (kurze Isoform)

2.7 siRNA-Sequenzen

Alle in der folgenden Tabelle aufgelisteten siRNA-Sequenzen wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

Tab. 2.9 Verwendete siRNA-Sequenzen

Gen	Sequenz
AllStar negative siRNA	Proprietär
cPLA2 (Pla2g4a)	CTGAACAACATTGATGTGATA TAGGAGAAACACTAATTCAAA AAGCCTGAGGATTCTCATTTA CCAGATGAATTTGAACGAATA
HDAC6	TTGGTGTGGATGAACAATA CAGGTGCTTATTTAAGTACAA GAGGATGACCCTAGTGTATTA CCGGCCAAGATTCTTCTACTA
LRSAM1	CAGGCCAGTACATGTAATCAA AACGTGCAAAGTTCTACAGAA CAGCAGATGGATCAGAACAAA CAGCATGTGCTCAACAAATAT
Parkin (Park2)	CACTGTGAATTTAACAGAGAA CACCAGCATCTTGCAGCTCAA CAGGGAGGACTCAGAAGCCAA CTGGAACAACAGAGTATTGTA

2.8 Kits

Tab. 2.10 Verwendete Kits

Kit	Herkunft
Aggresome Detection Kit	Abcam, USA
Annexin V-FITC Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
ATP-Assay-Kit	Abcam, USA
Cyto-ID Autophagy Detection Kit	Enzo, Lörrach, Deutschland
IMAGEN Chlamydia Kit	Oxoid, Wesel, Deutschland
JC-1 Kit	eBioscience, Österreich
L-Lactate Assay Kit	Abcam, USA
Mouse Dendritic Cell Nucleofector Kit	Lonza, Köln, Deutschland
Mouse Granzyme B Platinum ELISA	eBioscience, Österreich
Mouse IFN- γ Platinum ELISA	eBioscience, Österreich
Mouse NK Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim, Deutschland
ROS-Kit	eBioscience, Österreich

2.9 Glaswaren

Tab. 2.11 Verwendete Glaswaren

Glasware	Herkunft
Bechergläser	Schott-DURAN, Wertheim, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Erlenmeyer-Kolben	Schott-DURAN, Wertheim, Deutschland
Glaspipetten	Scherf-Präzision, Meiningen, Deutschland
Neubauerzählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pasteur-Pipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

2.10 Plastikwaren

Tab. 2.12 Verwendete Plastikwaren

Plastikware	Herkunft
Deckglasröhrchen	Thermo Fisher Scientific, USA
Einmalspritzen, Norm-Ject [®] (1 ml, 5 ml)	Henke Sass Wolf Tuttlingen, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Falcon, USA
Kryogefäße (1 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatten (6-, 12-, 96-well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real-Time PCR Gefäße	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (T25, T75, T162)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.11 Verbrauchsmaterial

Tab. 2.13 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Herkunft
Entwickler, Roentrol HG	Tetenal, Norderstedt, Deutschland
Fixierer, Superfix LR	Tetenal, Norderstedt, Deutschland
Nitrozellulose Protran [®] 0,45 mm	Thermo Fisher Scientific, USA
Parafilm	American National Can, USA
Röntgenfilm Super RX, 100 NIF	Fujifilm, Japan
Skalpellklingen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Whatman-Papier, 3 mm	Thermo Fisher Scientific, USA

2.12 Geräte

Tab. 2.14 Verwendete Geräte

Gerät	Herkunft
Abflamngerät	CFH, Offenau, Deutschland
Axiovert200/LSM 5 Exiter	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschränke	Bergmann, Berlin, Deutschland Forma Scientific, USA
C1000 Thermal Cycler	BioRad, München, Deutschland
Gel-Elektrophorese-System (Agarose)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Gel-Elektrophorese-System (SDS)	FLI Eigenbau
Kreisschüttler 3015	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Nikon ECLIPSE TS100	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
MACSQuant	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS (Magnetic Activated Cell Sorter)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer IKA-Combimag RTC	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Nano liquid-chromatography System	Bruker, England
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, USA
Nucleofactor II	Lonza, Köln, Deutschland
Pinzette	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Pipetten	Gilson, USA
Pipettierhilfe Accu Jet®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Röntgenfilm Entwickler Compact2	Brand, Wertheim, Deutschland
SONOREX RK 31 H, Ultraschall	Protect, Oberstenfeld, Deutschland
Sterilwerkbank Model 3336 S/N 32002	Bandelin, Witten, Deutschland
Stickstofftank Chronos	CEAG Schirp, Selm-Bork, Deutschland
Sunrise Remote ELISA Reader	Messer, Griesheim, Deutschland
T3 Thermocycler	Tecan, Crailsheim, Deutschland
TEM Tecnai-Spirit	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer 5436	FEI, Eindhoven, Niederlande
Tiefkühlschrank -20 °C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tiefkühlschrank -80 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Ultramikrotom UC7	Bruker, England
Vortex Genie 2	Leica, Wetzlar, Deutschland
Waage Mettler PE200	Scientific Industries, USA
Wasserbad Julabo U3	Mettler Waagen, Giessen, Deutschland
Western-Blotelektrophorese-Apparatur	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zentrifugen	FLI Eigenbau Heraeus Christ, Osterode, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.13 Wissenschaftliche Software

Tab. 2.15 Verwendete Software

Software	Herkunft
Agarose-Dokumentation Vision Capt 1	Peqlab, Erlangen, Deutschland
AxioVision	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CoLocalizer	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
IC-Capture	The Imaging Source, Bremen, Deutschland
Image Studio Lite	Li-Cor Biosciences, USA
Literaturverarbeitung Endnote X7	Thomson Reuters, USA
MACS Quantify	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magelan	Tecan, Deutschland
Mascot Server	Matrix Science, USA
PrimerBlast/NCBI	Nationale Institute of Health, USA
ProteinScape	Bruker, England
WARP-LC	Bruker, England

3 Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte in Inkubatoren bei 37 °C und 7,5%-iger CO₂-Sättigung, in dem für die jeweilige Zelllinie geeigneten Medium (s. Tab. 3.1). Je nach Wachstumsgeschwindigkeit und gewünschter Zelldichte wurden die verschiedenen Zelllinien alle 3-5 Tage passagiert.

Tab. 3.1 Eingesetzte Zellkulturmedien

Medium	Agenzien	Menge
JAWSII	IMDM	200 ml
	FCS	20 %
	Penicillin/Streptomycin	2 ml
	Amphotericin (5 mg/ml)	100 µl
	GM-CSF (100 µg/ml)	10 µl
KG-1	IMDM	200 ml
	FCS	20 %
	Penicillin/Streptomycin	2 ml
BGM, MN-R, RMA-S, YAC-1	IMDM	200 ml
	FCS	5 %, MN-R 10 %
	Penicillin/Streptomycin	2 ml
	Amphotericin (5 mg/ml)	100 µl
KY-2	RPMI1640 (2 mM L-Glutamin)	200 ml
	FCS	20 ml
	Penicillin/Streptomycin	2 ml
	β-Mercaptoethanol (10 µM)	7 µl/l
	IL-2	200 U/ml

Für die Chlamydieninfektion der Zellen wurde bei den JAWSII-Zellen Medium mit nur 10 % FCS verwendet, um einen besseren Infektionsgrad zu erzielen.

3.1.2 Auftauen von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden in einem auf 37 °C vorgeheizten Wasserbad schonend aufgetaut und in ein vorbereitetes Zentrifugenröhrchen mit 9 ml Kulturmedium überführt und anschließend bei 300xg für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand (ÜS) wurde vorsichtig dekantiert

und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche angemessener Größe überführt.

3.1.3 Passagieren der Zellen

Nach 3-5 Tagen, entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit und gewünschten Dichte der Zellen, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde bei den adhären Zellen zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und verworfen; bei den semi-adhären JAWSII-Zellen wurden die im Zellkulturmedium enthaltenen Suspensionszellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die adhären Zellen mittels 2 ml der entsprechenden Trypsin-EDTA-Lösung (s. Tab. 3.2) bzw. 1 mM EDTA in PBS im Falle der KY-2-Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Dafür wurden die Zellen für ca. 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 8ml des entsprechenden Kulturmediums. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen in Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300xg und RT zentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde vorsichtig dekantiert und das Zellpellet in einem angemessenen Volumen Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für die Weiterkultivierung geteilt oder die Zellzahl mithilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen in einer geeigneten Konzentration für die nachfolgenden Versuche in 6-well-Platten ausgesät.

Tab. 3.2 Eingesetzte EDTA-Trypsin-Lösungen

Zelllinie	Agenzien	Menge
JAWSII	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	Trypsin	2,5 g
	EDTA	0,3 g
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
BGM, MN-R, RMA-S, YAC-1	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	Trypsin	2,5 g
	EDTA	1,25 g
	ddH ₂ O	ad 1000 ml

3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Um eine dauerhafte Konservierung zu gewährleisten, wurden die Zellen wie unter 4.1.3 beschrieben vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden ca. 1×10^6 Zellen/ml in dem entsprechenden Einfriermedium (Tab. 3.3) aufgenommen und die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt, die zunächst für 24-72 h in *Cryo-Freezing* Behältern bei -70°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff gebracht wurden. Die KY-2-Zellen wurden direkt in FCS aufgenommen, dann wurde tropfenweise das gleiche Volumen an Einfriermedium hinzu titriert.

Tab. 3.3 Verwendete Einfriermedien

Zelllinie	Agenzien	Menge
BGM, JAWSII, MN-R, RMA-S, YAC-1	FCS	50 ml
	DMSO	10 %
KG-1	Kulturmedium	50 ml
	DMSO	5 %
KY-2	FCS	50 ml
	DMSO	20 %

3.1.5 Kontrolle der Zellen auf Mykoplasmenkontamination

In regelmäßigen Zeitabständen wurden die Zellkulturen auf Kontamination von Mykoplasmen hin untersucht, um eine vergleichbare Qualität der Zellkulturexperimente gewährleisten zu können. Mykoplasmen sind lichtmikroskopisch nicht erfassbar, greifen jedoch gravierend in den Stoffwechsel der Zellen ein und können somit ihre Eigenschaften verändern (Drexler and Uphoff 2002). Die Laborinterne Mykoplasmen-PCR basiert auf der Detektion der 16S-ribosomalen Untereinheit der Mykoplasmen. Für die Untersuchung wurden 100 μl des Zellkulturüberstandes von Zellen, die bereits mindestens 3 Tage in Kultur waren, abgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und für 5min bei $10000 \times g$ abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 2 μl für die Mykoplasmen-PCR eingesetzt.

Tab. 3.4 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Agenzien	Menge
Forward Primer (10 pmol)	1 μl
Reverse Primer (10 pmol)	1 μl
Interne Kontroll-DNA	1 μl
PCR Mix (5x)	4 μl
Kulturüberstand	2 μl
ddH ₂ O	ad 20 μl

Tab. 3.5 PCR-Temperaturprofil

Schritt	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	finale Elongation	Pause
Temperatur	95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Zeit	60 s	30 s	60 s	90 s	5 min	∞
29 Zyklen						

Anschließend wurden 5 µl des PCR-Amplifikates auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 3.6 Zusammensetzung eines 1%-igen Agarosegels

Agenzien	Menge
Agarose in TAE-Puffer	1 %
Ethidiumbromid	0,003 %

Bei kontaminierten Proben erschien neben dem Amplifikat der internen Kontrolle (500 bp), noch ein weiteres Amplifikat bei 550 bp.

3.2 Arbeiten mit Chlamydien

Sämtliche Arbeiten mit Chlamydien wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.1 Herstellung eines Chlamydienstocks

Aufgrund der obligat intrazellulären Lebensweise von Chlamydien, sind für die Anzucht Wirtszellen notwendig. Für die Herstellung von Chlamydienstocks kamen dabei die *buffalo-green-monkey* (BGM)-Zellen zum Einsatz, welche in T25- und T75-Zellkulturflaschen ausgesät wurden. Nachdem die Zellen in den T25-Flaschen nahezu vollständig konfluent waren, wurden diese mit einer MOI von 50 infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen mit 5 ml SPGA-Puffer, mithilfe eines Zellschabers, abgeschabt. Anschließend wurde die Chlamydienhaltige Zellsuspension gleichmäßig auf den nahezu konfluenten Zellrasen der T75-Zellkulturflaschen verteilt, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen. Abhängig vom Infektionsgrad, der regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert wurde, wurden die Zellen 24-48 hpi wie oben bereits beschrieben geerntet, die Chlamydien im Folgenden mittels Ultraschallbehandlung (3 x 10 s, 100 W) aus den

intakten Wirtszellen isoliert und die Zellsuspension schließlich in Aliquots zu je 100 µl bei -70 °C weggefroren.

Tab. 3.7 Zusammensetzung des SPGA-Puffers

Agenzien	Menge
Sucrose	74,6 g
KH ₂ PO ₄	0,52 g
K ₂ HPO ₄	1,25 g
L-Glutaminsäure	0,92 g
BSA	1 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

3.2.2 Titerbestimmung eines Chlamydienstocks

Der Titer des Chlamydienstocks wurde nach einwöchiger Lagerung bestimmt, da nach diesem Zeitraum kein Abfall des Titors mehr zu erwarten war. Für die Titerbestimmung wurden BGM-Zellen in T25-Zellkulturflaschen gesät und nach Erreichen einer Konfluenz des Zellrasens von ca. 80 % mit verschiedenen Verdünnungsstufen des entsprechenden Chlamydienstocks infiziert. 48 Stunden später wurden die Zellen mittels Trypsin vom Flaschenboden abgelöst und anschließend mithilfe des IMAGEN Chlamydia Kits (Oxoid) für die durchflusszytometrische Bestimmung intrazellulär angefärbt (s. Kapitel 3.3.5). Anhand der Gesamtzellzahl der Kontrolle, welche ebenfalls am Durchflusszytometer bestimmt wurde, dem prozentualen Anteil infizierter BGM-Zellen und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (F), konnte der Titer des Chlamydienstocks über die folgende Formel bestimmt werden:

$$\text{Chlamydientiter} \left[\frac{\text{IFU}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Gesamtzellzahl} \times \text{Anteil infizierter BGM – Zellen} [\%]}{100} \times F \times 10$$

Um den Chlamydientiter in IFU/ml angeben zu können, musste zusätzlich mit dem Faktor 10 multipliziert werden, da die Aliquots lediglich ein Zellsuspensionsvolumen von jeweils 100 µl umfassten.

3.2.3 Infektion von Zellen

Für die Infektionsversuche wurde zunächst die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen dann in der gewünschten Dichte, abhängig von dem jeweiligen Versuch, in 6-well-Platten, auf Deckgläschen oder in Zellkulturflaschen in Medium ohne Antibiotika ausgesät. Im Falle der

adhärenten Zellen, wurden diese je nach Dauer des Adhärenz-werdens, 1-3 Stunden nach der Aussaat mit Chlamydien infiziert. Dafür wurden die entsprechenden Chlamydienstocks aufgetaut und entsprechend der einzusetzenden MOI in Medium verdünnt. Die in Suspension vorliegenden KG-1-Zellen wurden vor der Chlamydieninfektion 24 Stunden lang mit Ionomycin (100 ng/ml) und PMA (10 ng/ml) vorbehandelt, wodurch die funktionale DC-Differenzierung induziert wird und die Zellen adhären werden. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden die verschiedenen Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit, entsprechend der in der nachstehenden Tabelle aufgelisteten MOIs infiziert.

Tab. 3.8 eingesetzte MOI für die Infektion der verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	eingesetzte MOI
BGM, KG-1, MN-R	30
JAWSII	10
KY-2	40

3.2.4 Reinfektionsassay

Im Rahmen eines Reinfektionsassays können Zellüberstände und Zellsuspensionen, die bereits mit Chlamydien infiziert waren, auf Infektiosität hin untersucht werden. Dafür wurden die entsprechenden Zellen zunächst in der gewünschten Dichte in 6-well-Platten in Medium ohne Antibiotika ausgesät und nach Adhärenz-werden infiziert. 48 Stunden später wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und je nach Versuch entweder vollständig für den Reinfektionsversuch eingesetzt, oder zunächst für 30 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und das erhaltene Chlamydien-Pellet in Zellkulturmedium aufgenommen und dann eingesetzt. Parallel wurden die Zellen mittels SPGA abgeschabt und im Anschluss im Ultraschallbad sonifiziert. Die erhaltenen Überstände bzw. Zellsuspensionen wurden dann für 24-48 Stunden auf BGM-Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Chlamydienanfärbung mithilfe des IMAGEN Chlamydia Kits (Oxoid) und die Messung mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel 3.3.5).

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit nicht-infektiösen Chlamydien aus NK-Zellen

8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden in mehreren Schritten mit nicht-infektiösen Chlamydien aus NK-Zellen immunisiert. Dafür wurden die Mäuse mit 200 µl intraperitoneal (IP) immunisiert, gefolgt von zwei weiteren Immunisierungen an Tag 14 und Tag 28, jeweils mit 200 µl intraperitoneal. Bei den Kontrollmäusen wurden parallel die drei Immunisierungsschritte mit sterilem PBS durchgeführt. Nach abschließenden sieben Tagen erfolgte die Tötung der Mäuse zur vollständigen Blutentnahme. Bei den nicht-immunisierten Tieren wurden zusätzlich noch die Milzen präpariert. Diese Arbeiten an Mäusen wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit Hilfe von Frau Stefanie Knöfel (FLI Insel Riems) durchgeführt (LALLF M-V Registrierungsnummer: 7221.3-2-042/17, FLI-Nr.: FLI 28/17).

3.3.2 NK-Zell-Isolierung aus Milzen nicht-infizierter Mäuse

Nach der Entnahme der Milzen aus nicht-infizierten Mäusen wurden diese zunächst in 15 ml Polystyrol-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Um die Zellen aus den Milzen freizusetzen wurden diese durchgeschnitten und mit leichtem Druck durch ein Zellsieb (70 µm) passiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde abzentrifugiert (10 min, 300xg, 4 °C) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die NK-Zellen mithilfe des Maus NK-Zell-Isolations Kits der Firma Miltenyi isoliert. Dabei wurden sämtliche „nicht NK-Zellen“ mittels eines Antikörpergemisches von Biotin-gekoppelten Antikörpern gebunden und mit anti-Biotin-Antikörpern aus der Zellsuspension entfernt. Die Separation erfolgte durch Anlegen eines magnetischen Feldes durch den MACS (Magnetic Activated Cell Sorter) der Firma Miltenyi. Die unmarkierten NK-Zellen wurden in einem Röhrchen gesammelt, in IL-2-haltigem Kultivierungs-Medium (s. 3.1.1) aufgenommen und kultiviert. Um die Reinheit der isolierten NK-Zellen zu bestimmen wurden diese mit einem PE-gekoppelten anti-NK1.1-Antikörper angefärbt und im MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen. Dabei waren 96 % der Zellen positiv für NK1.1 (s. Abb. 3-1).

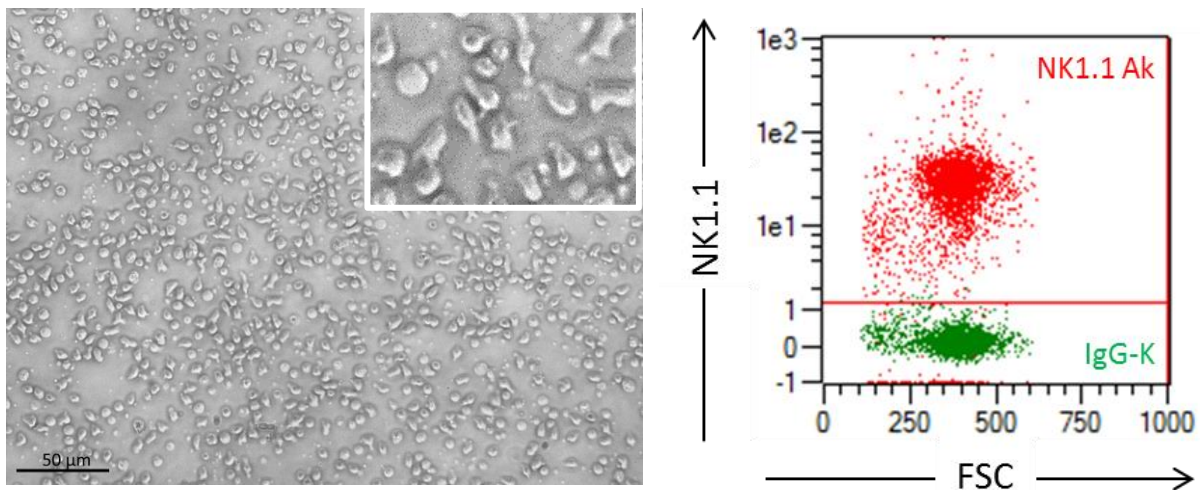


Abb. 3-1 Mikroskopische Darstellung isolierter Primärzellen und überlagerte *Dot-Blot*-Analysen von Kontroll- und NK1.1-Anfärbungen zur Bestimmung der Reinheit primärer NK-Zellen

Die MACS-isolierten Primärzellen wurden mithilfe eines Lichtmikroskops auf ihre Integrität hin begutachtet (Nikon, ECLIPSE TS100, 10x und 40x Vergrößerung) (links). Im Anschluss folgte eine durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung des Anteils NK1.1 positiver NK-Zellen (rot) des aus den Milzen von C57BL/6 Mäusen isolierten Zellmaterials. Als Isotypkontrolle (IgG-K) wurden NK-Zellen mitgeführt, die mit einem irrelevanten anti-Maus IgG2a/κ-Antikörper behandelt wurden (grün). Gezeigt ist eine Überlagerung der durchflusszytometrischen Messungen von Kontroll- (IgG-K) und NK1.1-Oberflächenfärbungen (NK1.1 Ak) primärer Maus NK-Zellen (rechts). Die grafische Erfassung der Messergebnisse als *Dot-Blot* erfolgte mithilfe der Miltenyi-Software MACSQuantify.

3.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie ist es möglich, die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins zu bestimmen, sowie Aussagen über die Co-Lokalisation und Interaktion verschiedener Proteine zu treffen. Dafür wurden die entsprechenden Zellen in der gewünschten Zellzahl auf Deckgläschen, die vorher abgeflammt und in 6-well-Platten platziert wurden, ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen wurden diese mit Chlamydien infiziert und je nach Versuch 24-72 Stunden lang inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde dann zunächst das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mittels Fixierpuffer für 20 min bei RT auf dem Schüttler. Danach wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und im Folgenden 10 min bei RT auf dem Schüttler in Waschpuffer permeabilisiert. Im Falle der Anfärbung von Zytoskelettelementen erfolgte die Fixierung der Zellen mittels eiskaltem 80%-igen Aceton für 15 min bei 4 °C ohne Schütteln. Um unspezifischen Bindungen entgegen zu wirken, wurden die Zellen dann für 1 h bei RT in Blockpuffer inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Zellen mit den gewünschten Primärantikörpern in den entsprechenden

Verdünnungen in Blockpuffer für 1 h bei RT. Danach wurden die Zellen drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern, verdünnt in Blockpuffer, für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dem erneuten dreimaligen Waschen mit Waschpuffer, wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert. Dafür wurden ca. 10 µl Einbettmedium, welches 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthielt, auf den Objektträger pipettiert und das Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten zeigend auf den Objektträger gelegt. Nach der Inkubation über Nacht in der Feuchtkammer bei 4 °C und dem darauffolgenden vollständigen Aushärten bei RT, wurde das Deckgläschen mit Nagellack am Objektträger fixiert. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die Präparate bei 4 °C gelagert.

Tab. 3.9 Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

Puffer/Lösungen	Agenzien
Fixierlösung	2 % Paraformaldehyd in PBS
Waschpuffer	0,1 % Saponin in PBS
Blockpuffer	0,1 % Saponin, 3 % BSA in PBS

3.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) können, durch den Einsatz von Elektronenstrahlen, die eine sehr viel kürzere Wellenlänge aufweisen als sichtbares Licht, Objekte in einer deutlich höheren Auflösung (bis in den nm-Bereich) abgebildet werden. Die Präparation und Untersuchung der gewünschten Objekte wurden in Kooperation mit Frau Professor Liebler-Tenorio vom FLI Jena (JAWSII-Zellen) sowie Frau Dr. Kati Franzke vom FLI Riems (Exosomen, NK-Zellen) durchgeführt.

Für die TEM-Analyse der DCs, wurden je 2×10^6 JAWSII-Zellen zunächst mit cPLA2-siRNA bzw. AllStarRNA transfiziert (s. Kapitel 3.5.4), in T75-Zellkulturflaschen gesät und 6 h später mit *C. psittaci* (MOI 25) infiziert. Nach 48 h wurden die im Zellkulturüberstand befindlichen Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet in kalter Fixierlösung aufgenommen. Außerdem wurden die adhärennten Zellen in der Zellkulturflasche mit Fixierlösung überschichtet. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit dem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 300xg für 5 min bei 4 °C wurde das Zellpellet mit Kakodylatpuffer überschichtet und bis zur weiteren Analyse bei 4 °C gelagert. Für die Analyse wurden die Zellen in 2 % flüssige Agarose eingebettet und anschließend in 1 mm³ große Würfel geschnitten. Danach wurden die Würfel in 2 % Osmium fixiert, mithilfe

verschiedener Acetonverdünnungen entwässert und mittels Araldit Cy212-Infiltration eingebettet. Nach der Polymerisation wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 85 nm angefertigt und in Uranylacetat und Bleicitrat inkubiert, um deren Kontrast zu erhöhen. Im Anschluss wurden die fixierten und kontrastierten Ultradünnschnitte im TEM analysiert.

Tab. 3.10 Verwendete Puffer und Lösungen für die TEM

Puffer/Lösungen	Agenzien
Kakodylatpuffer pH 7,4	0,1 M Natriumkakodylat in dH ₂ O
Fixierlösung	2,5 % Glutaraldehyd in Kakodylatpuffer

Für die TEM-Analyse der NK-Zellen, wurden je 5×10^5 KY-2-Zellen in T75-Flaschen gesät und mit *C. psittaci* (MOI 60) infiziert. Nach verschiedenen Infektionszeitpunkten wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mit Fixierlösung überschichtet. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit dem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, durch Zentrifugation pelletiert (300xg, 5 min, 4 °C) und das Pellet in Agarose mit einem niedrigen Schmelzpunkt aufgenommen. Kleine Teile dieses Gemischs wurden mit 1 % wässriger Osmiumtetroxid-Lösung nachfixiert und mit Uranylacetat gefärbt. Nach schrittweiser Entwässerung in Ethanol wurden die Zellen in Propylenoxid aufgenommen und schließlich in Glycidether 100 eingebettet. Die Polymerisationszeit betrug drei Tage bei 60 °C. Im Anschluss wurden mittels Ultramikrotom (UC7, Leica) Ultradünnschnitte der Zellen angefertigt, die mit Uranylacetat und Bleiacetat gegengefärbt wurden. Die Analyse der Schnitte erfolgte mit einem Tecnai-Spirit TEM (FEI) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV (Klupp, Granzow, and Mettenleiter 2000).

Für die Analyse von DC-stämmigen Exosomen in der TEM kam die Methode der Negativkontrastierung zum Einsatz. Dafür wurden die Exosomen zunächst, wie unter Kapitel 3.4.4 beschrieben, isoliert. Anschließend wurde die Probe auf ein befilmtes 400-mesh Nickel-Netz gebracht und für 7 min inkubiert. Danach wurde die Probe abgesaugt und Phosphowolframsäure pH 6,0 als Kontrastmittel auf das Netz gebracht. Es folgte eine erneute Inkubation für 7 min und das anschließende Absaugen des Kontrastmittels. Nachdem das Netz getrocknet war, erfolgte die Analyse der Exosomen am Tecnai-Spirit TEM (FEI) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV.

3.3.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, das äquivalent zur Immunfluoreszenzmikroskopie, auf der Interaktion von Antikörpern mit ihrem spezifischen Antigen

basiert. Auf diese Weise ermöglicht es diese Methode, Oberflächenmoleküle sowie intrazelluläre Proteine von Partikeln, wie Zellen oder Beads zu quantifizieren. Zellen oder Beads, an die der Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper gebunden hat, werden bei der Durchflusszytometrie durch einen Flüssigkeitsstrom vereinzelt und an Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen vorbeigeführt. Auf diese Weise kann, neben dem zu untersuchenden Protein, auch die Größe und Granularität der Partikel bzw. Zellen untersucht werden. Durch die Verwendung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern mit verschiedenen Emissionsspektren, ist die parallele Quantifizierung und Analyse mehrerer Strukturen möglich.

Anfärben von Oberflächenmolekülen

Um Oberflächenmoleküle von Zellen anzufärben, wurden die Zellen zunächst mittels Trypsin vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst, die Reaktion mit Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellen für 5 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der ÜS verworfen und die Zellen mit 1 ml kaltem DFN gewaschen (3500 rpm, 5 min, RT). Dann folgte die Inkubation des gewünschten Primärantikörpers in der entsprechenden Verdünnung in 200 µl DFN für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler. Die Zellen wurden wie oben bereits beschrieben mit DFN gewaschen, im Anschluss wurden sie mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, verdünnt in 100 µl DFN, für 30 min bei 4 °C im Dunkeln im Überkopfschüttler inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Zellpellet in einem geeigneten Volumen (200-500 µl) PBS resuspendiert und die Proben am MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen.

Anfärben von intrazellulären Proteinen und Chlamydien

Um intrazelluläre Proteine von Zellen anfärben zu können, ist ein Permeabilisierungsschritt notwendig, der den Fluoreszenz-markierten Antikörpern den Zutritt in die Zelle ermöglicht. Die Zellen wurden auch hier zunächst mittels Trypsin vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst, die Reaktion mit Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellen für 5 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der ÜS verworfen und die Zellen mit 1 ml kaltem DFN gewaschen (3500 rpm, 5 min, RT). Daraufhin erfolgte die Fixierung der Zellen mit 200 µl Fixierpuffer für 10 min bei RT, gefolgt von einem Blockschrift in 200 µl Blockpuffer. Im Anschluss wurden die Zellen in 200 µl Waschpuffer für 30 min bei RT auf dem Überkopfschüttler permeabilisiert. Dann folgte die Inkubation der Zellen mit dem gewünschten Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in 200 µl Waschpuffer für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler. Die Zellen wurden, wie oben bereits beschrieben, mit Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, verdünnt in 200 µl Waschpuffer, für 30 min bei 4 °C im Dunkeln im Überkopfschüttler inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Zellpellet letztendlich in

einem geeigneten Volumen (200-500 µl) PBS resuspendiert und die Proben am MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen. Die intrazelluläre Chlamydienanfärbung erfolgte in einer Einschrittanfärbung mithilfe des IMAGEN Chlamydia Kits (Oxoid).

Tab. 3.11 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Puffer/Lösungen	Agenzien
500x DAB	449 mM $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ 246 mM $\text{MgCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$
DFN	10 % FCS in PBS 0,2 % 500 x DAB 0,1 % Natriumazid
Fixierpuffer	2 % PFA in PBS
Blockpuffer	10 mM Glycin in PBS
Waschpuffer	0,5 % BSA 0,5 % Saponin in PBS

3.3.6 Messung der Autophagie

Für die Bestimmung der autophagosomalen Aktivität der Zellen, wurde nach Herstellerangaben der Cyto-ID Detection Kit der Firma Enzo herangezogen. Dieser ist so konzipiert, dass er spezifisch Autophagosomen und Autolysosomen, nicht jedoch Lysosomen anfärbt. Für die Untersuchung der autophagosomalen Aktivität mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen in phenolrot-freiem Medium in entsprechende Zellkulturgefäße gesät und im Anschluss infiziert oder anderweitig behandelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten erfolgte dann zunächst ein Waschschriff mit Medium, dann wurden 200 µl phenolrot-freies Medium pro *well* vorgelegt und mit 200 µl der Cyto-ID-Färbelösung, bestehend aus 2 µl Cyto-ID Green Detection Reagent in 1 ml phenolrot-freiem Medium, ergänzt. Es folgte eine 1 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank, sowie drei Waschschriffe mit Medium. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturgefäße gelöst, die Reaktion mit FCS inaktiviert und die Zellen für 5 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach einem Waschschriff in 1 x Assaypuffer erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von 200 µl 2 % PFA in PBS für 20 min bei RT auf dem Überkopfschüttler. Nach einem weiteren Waschschriff in PBS wurden die Zellen in einem entsprechenden Volumen 1 x Assaypuffer (200-500 µl) aufgenommen und die Proben am MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen. Um die autophagosomalen Strukturen für die Immunfluoreszenzmikroskopie anzufärben, wurde bis zur Behandlung der Zellen mit der Cyto-ID-Färbelösung, genauso verfahren wie für die Durchflusszytometrie. Anschließend wurden die Zellen, die auf Deckgläschen ausgesät waren, 3 Mal mit PBS gewaschen und dann für 10 min bei RT auf dem Schüttler mit 0,5 ml 2 % PFA in PBS fixiert. Nach wiederholtem 3-maligen Waschen mit PBS erfolgte das Blocken mit 10mM Glycin in PBS für

10 min bei RT auf dem Schüttler. Im Folgenden wurden die Deckgläschen dann, wie im Kapitel Immunfluoreszenzmikroskopie (3.3.3) beschrieben, in Einbettmedium auf dem Objektträger fixiert.

3.3.7 Messung der gebildeten Aggresomen

Für die Messung der gebildeten Aggresomen in Zellen kam nach Herstellerangaben das Aggresome Detection Kit der Firma Abcam zum Einsatz. Dafür wurden die Zellen zunächst mit Chlamydien infiziert oder mit 5 μ M MG-132, einem Proteasom-Inhibitor, der als Positivkontrolle eingesetzt wurde, inkubiert. Zu den entsprechenden Infektions- bzw. Behandlungszeitpunkten wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst, 2 Mal mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 200 μ l PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann zu 2 ml 4 % Paraformaldehyd-Lösung getropft, vorsichtig mittels Vortex gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 800xg für 10 min bei RT wurde das Zellpellet in einem kleinen Volumen des Überstands resuspendiert und die Zellsuspension zu 2 ml vorgelegter Permeabilisierungslösung getropft. Es folgte eine 30 min Inkubation auf Eis, gefolgt von einem erneuten Zentrifugationsschritt (800xg, 10 min, RT) und zwei Waschschritten in PBS. Schließlich wurde das Zellpellet in 500 μ l Aggresome *Red Detection Reagent* aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte die Messung der gebildeten Aggresomen am MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec).

3.3.8 Messung des oxidativen Stresses

Für die Messung von oxidativem Stress in Zellen wurde das CellROX® Green Reagent der Firma Life Technologies nach Herstellerangaben eingesetzt. Bei diesem handelt es sich um einen membrangängigen Farbstoff, der in seinem reduzierten Zustand schwach fluoresziert und bei Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine grüne photostabile Fluoreszenz zeigt. Um die ROS-Produktion in Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst für verschiedene Zeitspannen infiziert oder anderweitig behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 μ M CellROX® Green Reagent zum Zellkulturmedium und eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturgefäße gelöst, durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 1300 rpm, RT), das erhaltene Pellet noch einmal mit PBS gewaschen und die in PBS resuspendierten Zellen schließlich am MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen.

3.3.9 Untersuchung des mitochondrialen Membranpotenzials

Um die Vitalität von Mitochondrien in Zellen zu untersuchen, wurde nach Herstellerangaben das JC-1-Kit der Firma eBiosciences eingesetzt. Mithilfe dieses Kits ist es möglich das Verhältnis von intakten zu geschädigten Mitochondrien zu bestimmen. Basierend auf intaktem oder geschädigtem Membranpotenzial der Mitochondrien, liegt der Farbstoff als rot-fluoreszierendes J-Aggregat oder grün-fluoreszierendes Monomer vor. Für diese Untersuchungen wurden JAWSII-Zellen mit Chlamydien infiziert oder anderweitig behandelt. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst und nach der Zentrifugation (3500 rpm, 5 min, RT) in 500 µl PBS aufgenommen. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen im Folgenden für 5 min bei 37 °C mit CCCP (Endkonzentration 50 µM), einem Entkoppler der mitochondrialen Elektronentransportkette, inkubiert. Es folgte die Zugabe von JC-1 (Endkonzentration 2 µM) und die Inkubation der Zellen bei 37 °C für 15 min. Die Zellen wurden mit 500 µl PBS gewaschen (3500 rpm, 5 min, RT), das Zellpellet in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen und am MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen.

3.3.10 Messung der Apoptose

Die Messung der Apoptoseinduktion in Zellen erfolgte nach Herstellerangaben unter Einsatz des Annexin-V-FITC-Kits der Firma Miltenyi Biotec. Dafür wurden die Zellen zunächst in 6-*well*-Platten ausgesät und mit Chlamydien infiziert oder anderweitig behandelt. Zu den gewünschten Infektions-/Behandlungszeitpunkten wurden die Zellen dann nach Ablösen vom Boden des Zellkulturgefäßes mit 1x *Binding Buffer* gewaschen (300xg, 10 min, RT). Anschließend wurde das Zellpellet in 50 µl *Binding Buffer*, der in einer Verdünnung von 1:10 mit Annexin V-FITC supplementiert wurde, resuspendiert und für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschriff und die Aufnahme des Zellpellets in *Binding Buffer*. Falls erforderlich, wurde anschließend noch Propidiumiodid-Lösung, in einer Verdünnung von 1:100, zugegeben um zusätzlich die Nekrose in den Zellen zu untersuchen. Es folgte die Messung der Apoptose/Nekrose am MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec).

3.3.11 Killing-Assay

Um die Fähigkeit von NK-Zellen, Zielzellen zu töten zu untersuchen, wurden NK-Zellen in 12-well-Platten ausgesät und für 5 h mit RMA-S- oder YAC-1-Zellen co-kultiviert. Ausgewählt wurde für diesen Assay ein Effektor:Targetzell-Verhältnis von 10:1 (RMA-S) bzw. 20:1 (YAC-1). Nach der erfolgten Inkubationszeit wurden die Zielzellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst, wobei die Effektorzellen aufgrund ihrer Adhärenz zurückblieben. Die Zellen wurden dann ein Mal mit PBS gewaschen (3500 rpm, 5 min, RT), das Zellpellet dann in PBS, das in einem Verhältnis von 1:100 mit Propidiumiodid supplementiert wurde, aufgenommen und der Anteil toter Zellen schließlich am MACSQuant-Durchflussszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen. Als Kontrolle dienten dabei Zielzellen, die unmittelbar vor der Probenaufarbeitung zu Effektorzellen gegeben wurden.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellen von Zelllysaten

Für das Herstellen von Zelllysaten für die Western-Blot-Analyse wurden die Zellen zunächst in einer entsprechenden Zelldichte, vorzugsweise in 6-well-Platten, ausgesät und, nach Anheften auf dem Boden der Kulturflasche, mit Chlamydien infiziert oder anderweitig behandelt. Zu den jeweiligen Infektions-/Behandlungszeitpunkten, wurde das Medium dann, je nach Versuch verworfen oder ebenfalls in einem Zellkulturgefäß gesammelt, die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst und nach Zugabe von Zellkulturmedium für 5 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen (5 min, 3500 rpm, RT). Dann wurde mittels Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt und das Zellpellet, nach erneuter Zentrifugation, in Lysepuffer resuspendiert, wobei pro 1×10^6 gezählte Zellen 100 µl Puffer zum Einsatz kamen. Die Lyse der Zellen erfolgte für 30 min auf Eis, gefolgt von einem 30 min Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und 4 °C. Nach Überführung des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß, wurde das Lysat, bis zur elektrophoretischen Auftrennung, bei -20 °C gelagert.

Tab. 3.12 Puffer für die Herstellung von Zelllysaten

Puffer	Agenzien
RIPA-Harnstoff-Puffer	50 mM Tris HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,25 % DOC 1 x Complete/50 ml 5 mM Na-Fluorid 3 M Harnstoff
Triton X-100	1 % Triton X-100 in PBS 1x Complete/50ml

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE können Proteine aus einem Zelllysate entsprechend ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufgetrennt werden (Laemmli 1970). Dafür werden die Zelllysate mit Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt, welches gleichmäßig an die Proteine bindet, sie denaturiert und ihnen eine negative Ladung verleiht. Diese Behandlung ermöglicht bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel, welches ebenfalls SDS enthält, eine ausschließliche Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Tab. 3.13 Zusammensetzung des Acrylamidgels

Agenzien	Sammelgel	Trenngel (10 %)	Trenngel (15 %)
Acrylamid	1,3 ml	10 ml	15 ml
Trenngelpuffer*		7,5 ml	7,5 ml
Sammelgelpuffer**	2,5 ml		
dH ₂ O	6,1 ml	12 ml	7 ml
10 % SDS-Lösung	100 µl	300 µl	300 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	20 µl	30 µl	30 µl

*Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, **Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Die Zelllysate wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer verdünnt und für 10 min bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurden 50 µl des verdünnten Zelllysats auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1 x Elektrophoresepuffer (E-Puffer) bei einer Stromspannung von 200 V. Als Molekulargewichtsmarker kam der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas zum Einsatz.

Tab. 3.14 eingesetzte Puffer für die SDS-PAGE

Puffer	Agenzien	Menge
2x SDS Probenpuffer	10 % SDS-Lösung	20 ml
	Glycerin	10 ml
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	12,5 ml
	H ₂ O	7,5 ml
	Bromphenolblau	wenige Kristalle
	β-Mercaptoethanol	7 % (frisch zugeben)
10x E-Puffer (in H ₂ O)	Tris	250 mM
	Glycin	1,9 M
1x E-Puffer	10x E-Puffer	100 ml
	10 % SDS-Lösung	10 ml
	H ₂ O	890 ml

3.4.3 Western-Blot-Analyse

Nachdem die Zelllysate mittels SDS-PAGE entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt wurde, erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm), bei einer Stromstärke von 500 mA, abhängig von der Größe des gewünschten Proteins für 20-45 min. Als Blotpuffer diente 1x E-Puffer, der ohne SDS angesetzt wurde. Nach dem Blotten wurde der Transfer der Proteine auf die Membran zunächst mithilfe einer reversiblen Ponceau S-Färbung überprüft. Anschließend wurde diese durch Waschen der Membran in Wasser und darauffolgend in 0,1 % Tween-20 in PBS wieder entfernt. Über Nacht erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen in Blockpuffer bei 4 °C auf dem Schüttler. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dann, nach dreimaligem 5 min Waschen in Waschpuffer, mit dem gewünschten Primärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei erneuten Waschschritten wurde die Membran mit einem entsprechenden *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt in Blockpuffer, für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei Waschschritten erfolgte die Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper durch eine *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Reaktion. Dabei wird Luminol oxidativ unter dem Einfluss von Wasserstoffperoxid umgesetzt, katalysiert durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP. Die dabei erfolgende Emission von Licht kann durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Blotmembran detektiert werden.

Tab. 3.15 verwendete Lösungen für die Western-Blot-Analyse

Lösungen	Agenzien	Menge
Ponceau S	Ponceau in PBS	0,1 %
	Essigsäure	5 %
Waschpuffer	Tween-20 in PBS	0,1 %
Blockpuffer	FCS in PBS/Tween-20	5 %
ECL A	H ₂ O	88,56 ml
	1 M Tris-HCl pH 8,5	10 ml
	250 nM Luminol	1 ml
	p-Cumarinsäure	90 mM
ECL B	H ₂ O	89,94 ml
	Tris-HCl pH 8,5	10 ml
	30 % H ₂ O ₂	60 µl

Die beiden ECL-Lösungen wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und die Blotmembran für 1 min darin, unter schütteln, inkubiert. Detektiert wurde die ECL-Reaktion mithilfe der automatischen Entwicklermaschine Compact 2 der Firma Protec. Anschließend erfolgten, je nach Versuch, Anfärbungen mit weiteren Primärantikörpern und den dazugehörigen HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern.

3.4.4 Isolation von Exosomen

Für die Isolation von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand von JAWSII-Zellen, wurden 1×10^6 Zellen in eine T75-Zellkulturflasche gesät und die Flasche auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Nach Adhärenz der Zellen wurden diese mit *C. psittaci* mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 10 infiziert und für 48 h bei 37 °C und 7,5 % CO₂-Sättigung inkubiert. 48 hpi wurde das Kulturmedium abgenommen, für 15 min bei 3000xg und RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Der ÜS wurde dann mit 2 ml ExoQuick-TC™-Lösung (System Biosciences) supplementiert, das Röhrchen 3 Mal vorsichtig geschwenkt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte zunächst die Zentrifugation bei 1500xg für 30 min bei RT, anschließend wurde der ÜS abgenommen und verworfen und das Exosomenpellet noch einmal für 5 min bei 1500xg und RT zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet, abhängig von der gewünschten Untersuchungsmethode, in 200 µl Ripa-Puffer für die Western Blot-Analyse oder 500 µl PBS für alle weiteren Analysen, aufgenommen. Nach der Aufnahme in Ripa-Puffer wurde die Exosomenlösung mittels Vortex homogenisiert, dann erfolgte die 5 min Lyse bei RT. Bis zur weiteren Analyse wurden die Exosomenlösungen bei -20 °C gelagert.

Tab. 3.16 Zusammensetzung des Ripa-Puffers für die Exosomenanalyse

Agenzien	Menge
25 mM Tris pH 7,6	0,15 g
150 mM NaCl	0,22 g
1 % NP-40	500 µl
1 % DOC	0,5 g
0,1 % SDS	50 µl
ddH ₂ O	ad 50 ml

3.4.5 Isolation von Aggresomen

Aggresomale Zellstrukturen wurden nach der experimentellen Vorschrift von Bader *et al.*, 2012 (Bader et al. 2012) isoliert. Dafür wurden JAWSII-Zellen in einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen in eine T75-Zellkulturflasche gesät und nach Adhärenz werden der Zellen mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gewaschen, dann wurden die Zellen in 1 ml PBS, das außerdem Proteaseinhibitor (Complete, Roche) und Phosphatase-Inhibitor enthielt, vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt und anschließend mittels Dounce Homogenizer (30-40 Strokes) aufgeschlossen. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann auf Eis gekühlt, mit 1 ml Lysepuffer versetzt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Sucrose-Gradient, bestehend aus jeweils 2 ml 80 %, 50 % und 20 % Sucrose (w/v) in PBS, pH 7,4 in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegossen. Anschließend wurde das Zellhomogenat vorsichtig auf die oberste Schicht des Sucrose-Gradienten aufgetragen und für 15 min bei 1000xg und 4 °C zentrifugiert. Im Folgenden wurde die Aggresomen-haltige Interphase zwischen der 50 % und 80 % Sucrose-Schicht vorsichtig abgesaugt, mit 1 ml PBS versetzt und noch einmal für 15 min bei 1000xg und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch 2 Mal wiederholt, dann wurde das erhaltene Aggresomenpellet in 50 µl ABC-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Tab. 3.17 Verwendete Puffer für die Aggresomenisolation

Lösungen	Agenzien
Lysepuffer (in PBS)	10 mM MgCl ₂ 40 U/ml DNase A Phosphatase-Inhibitor (1 Tablette/10 ml)
ABC-Puffer	50 mM Ammoniumbicarbonat, pH 8

3.4.6 Metabolische Markierung von JAWSII-Zellen

Dialysiertes fötales Kälberserum (FCS) wurde zunächst mittels ExoQuick-TC-Kit-Behandlung (BioCat) (3.4.4) und anschließender Ultrazentrifugation (TLA55 Rotor, 180 min, 55.000 rpm, 4 °C) für Rinderzell-Exosomen depletiert. Für die metabolische Markierung der JAWSII-Zellen wurden die Zellen in Arginin-/Lysin-freiem IMDM-Medium (IMDM für SILAC, Thermo Fisher Scientific) mit 5 % Exosomen-depletiertem FCS sowie den ¹³C-markierten Isotopomeren von Arginin (0,398 mM) und Lysin (0,798 mM) (Silantes) kultiviert. Zur Überprüfung des kompletten Isotopenaustauschs in den JAWSII-Zellen, wurden die Zellen in SDS-Ladepuffer lysiert und 20 µg der Proben in einem Laemmli-Gradienten-Gel (7,5-15 % Acrylamid) (Laemmli 1970) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Sechs willkürlich ausgesuchte Proteinbanden wurden isoliert und mittels eines Standard-In-Gel-Verdaus entsprechende Peptid-Fingerprint-Massen-Spektren erstellt (Shevchenko et al. 2006). Peaks von Peptiden mit einem sogenannten MS/MS High-Score wurden im Bereich der zu erwartenden Massenregionen auf "Light Peaks" passender nicht-markierter Peptide hin untersucht. Der Austausch wurde als komplett angesehen, wenn das Signalverhältnis zwischen markierten und nicht markierten Peaks größer als 98:1 war. Diese Arbeiten wurden unter Anleitung von Frau Barbara Bettin (FLI Riems) durchgeführt.

3.4.7 Identifizierung von Proteinen mittels nLC-MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie

Bei der MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization, time of flight) Massenspektrometrie handelt es sich um ein Verfahren, das zur Bestimmung der Masse von Molekülen in der Größenordnung von 5-500 kDa eingesetzt wird. Dabei wird die zu untersuchende Probe zunächst in Matrix-Material eingebettet und anschließend mithilfe von Laserpulsen ionisiert. Im Anschluss werden die entstandenen Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und ihre Flugzeit mithilfe eines TOF-Analysators bestimmt. Die Probenaufarbeitung sowie massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herr Dr. Axel Karger vom FLI Riems durchgeführt.

Für die massenspektrometrische Analyse aggresomaler Proteine wurden die isolierten Aggresomen zunächst vakuumgetrocknet, mittels 8 M Harnstoff/NH₄HCO₃ extrahiert und anschließend ultraschallbehandelt. Die DTT-reduzierten Aggresomenproben wurden unter Verwendung von Iodacetamid alkylisiert und anschließend mittels Trypsin verdaut. Die entstehenden Peptide wurden über Festphasenextraktion gewonnen und für die Nano-Liquid Chromatographie (nLC) in 0,1 % Trifluoressigsäure gelöst. Die Peptidanalyse erfolgte mittels nLC-MALDI-TOF/TOF MS auf einer

entsprechenden nLC/UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF-Plattform (Bruker). Die Fraktionierung wurde mittels Acetonitril-Gradient (2-45 %) unter Verwendung einer Acclaim PepMap100 Säule (Thermo Scientific) durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte unter Verwendung der WARP-LC Software (Bruker) und die Fragmentspektren wurden mithilfe des MASCOT Servers analysiert. Zur Identifizierung von Wirtsproteinen wurde die auf *Mus musculus* eingegrenzte Swissprot 2 Datenbank verwendet. Für die chlamydialen Proteine wurde die entsprechende Datenbank der Proteinsequenzen von *C. psittaci* 02DC15 (Genbank NC_017292.1, 3) verwendet. Für die weitere Evaluierung der Daten wurden alle MASCOT Resultate abschließend in die ProteinScape Software (Bruker) exportiert. Aus den Peptidspektren wurden Proteinidentitäten mittels Protein Extractor (PE)/ProteinScape generiert. Der Minimum MASCOT Peptide Score wurde auf 15 gesetzt und der Signifikanzlevel auf 0,95. Die Proteinquantitäten wurden auf der Basis des emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance)-Index ermittelt (Ishihama et al. 2005).

Für die massenspektrometrische Analyse von Exosomen aus infizierten DCs, wurden JAWSII-Zellen zunächst wie unter Abschnitt 3.4.6 beschrieben metabolisch markiert. Nach dem kompletten Isotopenaustausch wurden die Zellen in einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen in eine T75-Zellkulturflasche gesät, mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert und 48 h später Exosomen aus dem Zellkulturüberstand isoliert (3.4.4). Nach der anschließenden Ultrazentrifugation bei 40000 rpm für 90 min bei 4 °C (TLA55 Rotor), wurde das finale Exosomenpellet in SDS-Puffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M DTT, 2 % SDS) bei 99 °C für 5 min lysiert (Nagaraj et al. 2011). Die Exosomenlysate wurden mittels Trypsin (Promega) nach dem FASP-Protokoll (Wisniewski et al. 2009) und unter Anwendung von Vivacon 500 Filtereinheiten (30,000 MWCO, Hydrosartmembran, Sartorius) verdaut. Die Peptide wurden im Anschluss unter Verwendung einer Empore HP Extraction Disk Cartridge (C18-SD, 3 M) entsalzt und mittels nLC-MALDI-TOF-MS/MS Plattform (bestehend aus Nano Liquid Chromatographie System (EASY-nLC II, Bruker), Proteineer fcll Sample Spotting Roboter (Bruker), und einem UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF Instrument (Bruker)) analysiert (Henning et al. 2014). Hierfür wurden 4 µg des verdauten Proteins in 10 µl 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) verdünnt und in eine NS-MP-10 BioSphere Loading/Desalting-Säule (C18 Säule von NanoSeparations) injiziert. Nach Waschung mit 40 µl 0,05 % TFA folgte die Elution auf eine analytische Säule (Acclaim Pepmap, Thermo Fisher) mit einer konstanten Flussrate von 300 nl/min. Die chromatographische Trennung erfolgte mithilfe eines binären linearen Gradienten von Puffer A (0,05 % TFA) und B (90 % Acetonitril (ACN), 0,05 % TFA). Die Gradientenzusammensetzung wurde während des 64 min Laufes von 2 % B auf 45 % B geändert. Es wurden Fraktionen von 50 nl auf einer 384-Spot Anchor Chip Target Platte gesammelt (Bruker). Die Eluate wurden abschließend mit 416 nl α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure/Fraktion als Matrix gemischt. Die maximale Anzahl von Fragmentspektren pro zu untersuchendem Spot wurde auf 40 gesetzt und das Signal-Rausch (S/N)-Verhältnis für die MS-Spektren erhielt den Wert von 7. Fragmentspektren

wurden mit Hilfe des MASCOT-Servers (Version 2.4.1, Matrixscience) untersucht und die Resultate der Datenbankabfrage zur weiteren Analyse in die ProteinScape Software (Bruker) exportiert. Zur weiteren Evaluierung wurden Proteinidentitäten der Peptidspektren mit Hilfe des Protein Extractors(PE)/ProteinScape rekonstruiert. Die Massentoleranz wurde auf 25 ppm (MS) und 0,7 Da (MS/MS) gesetzt. Der minimale MASCOT-Peptide-Score zur Auswertung der Resultate durch die PE Software wurde hierzu auf 15 gesetzt. Der Schwellenwert der Signifikanz der MASCOT Software lag bei 0,05. Für die finale Auswertung wurden aus Uniprot zwei Datenbanken zu Proteomen der Maus (*Mus musculus*) und des Rinds (*Bos taurus*) erstellt (The UniProt 2017). Bei der Maus-Datenbank wurden zusätzlich MASCOT-Anfragen unter Berücksichtigung von Methioninoxidationen, N-terminalen Proteinacetylierungen, Carbamidomethylierungen von Cystein sowie Arginin- und Lysin-Modifikationen durchgeführt. Netzwerkanalysen und GO-Term-Enrichment-Analysen wurden mittels STRING-Software durchgeführt (Szklarczyk et al. 2017).

3.4.8 L-Lactatassay

Für den quantitativen Nachweis von L-Lactat in Chlamydien-infizierten sowie anderweitig behandelten DCs, wurde der L-Lactate Assay Kit der Firma Abcam verwendet. Dabei wurden JAWSII-Zellen in einer Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen in T75-Flaschen ausgesät und, nachdem die Zellen adhären geworden waren, für 24-72 h mit Chlamydien infiziert oder anderweitig behandelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde dann, nach Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mittels Trypsin, die Zellzahl mithilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt, um die erhaltenen L-Lactat-Werte auf die entsprechende Zellzahl der Probe normieren zu können. Bei der Durchführung wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Eingesetzt wurden 50 µl der unverdünnten Zellsuspension. Die kolorimetrische Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm am Sunrise Remote ELISA Reader (Tecan) gemessen.

3.4.9 Messung der ATP-Konzentration in Zellen

Die Messung der ATP-Konzentration in Zellen erfolgte mithilfe des ATP-Assay Kits der Firma Abcam. Dafür wurden 3×10^5 JAWSII-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und anschließend mit Chlamydien infiziert. Zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten wurden die Zellen dann, mithilfe von Trypsin, vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst und anschließend entsprechend des Herstellerprotokolls weiter behandelt. Die kolorimetrische Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm am Sunrise Remote ELISA Reader (Tecan) gemessen.

3.4.10 IFN- γ -ELISA

Um IFN- γ quantitativ im Zellkulturüberstand von Chlamydien-infizierten bzw. mit Exosomen behandelten NK-Zellen nachzuweisen, kam der IFN- γ Platinum ELISA der Firma eBioscience zum Einsatz. Dieser enthielt bereits mit IFN- γ -spezifischen Antikörpern konjugierte 96-well Platten. Zunächst wurden KY-2-Zellen in einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen in 12-well-Platten ausgesät und nachdem sie adhärent geworden waren, für 72 h mit verschiedenen Volumina an Exosomen, die zuvor aus dem Zellkulturüberstand von mit *C. psittaci*-infizierten JAWSII-Zellen (MOI 10) isoliert wurden (s. Kapitel 3.4.4), inkubiert oder für 24-72 h mit Chlamydien infiziert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden dann die Zellkulturüberstände abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt im ELISA-Test eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverwendung bei -70 °C gelagert. Bei der Durchführung des ELISA-Assays wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Eingesetzt wurden jeweils 50 μ l des unverdünnten Zellkulturüberstands, außerdem wurden verschiedene Verdünnungen von 1:100 bis 1:500 in Sample Diluent mitgeführt. Die Messung der kolorimetrischen Reaktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm am Sunrise Remote ELISA Reader (Tecan).

Für die Untersuchung der funktionalen Antigenpräsentation von JAWSII-Zellen, wurden diese, wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben, für 24 h mit Chlamydien infiziert und ggf. anderweitig vorbehandelt. Anschließend erfolgte die 48 h Co-Kultivierung mit CD8⁺ T-Zellen (3.6.2) in einem DC:T-Zell-Verhältnis von 1:6. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und direkt im ELISA-Test eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverwendung bei -70 °C gelagert. Bei der Durchführung des ELISA-Assays wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Eingesetzt wurden jeweils 50 μ l des unverdünnten Zellkulturüberstands. Für jeden Ansatz wurden dabei jeweils 4 Vertiefungen einer 96-well Platte verwendet. Die Messung der

kolorimetrischen Reaktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm am Sunrise Remote ELISA Reader (Tecan).

3.4.11 Nachweis von Granzym-B

Für den quantitativen Nachweis von Granzym-B im Zellkulturüberstand von Chlamydien-infizierten oder anderweitig behandelten NK-Zellen, wurde der Mouse Granzyme B Platinum ELISA der Firma eBioscience eingesetzt. Dabei wurden die KY-2-Zellen in einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen in T25-Zellkulturflaschen gesät und im Anschluss für 24-72 h mit Chlamydien infiziert oder anderweitig behandelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden dann die Zellkulturüberstände abgenommen, für 5 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und direkt im ELISA-Test eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Bei der Durchführung des Granzym-B-Assays wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Eingesetzt wurden jeweils 50 μl des unverdünnten Zellkulturüberstands, außerdem wurden die Verdünnungen von 1:10 und 1:50 in Sample Diluent mitgeführt. Die Messung der kolorimetrischen Reaktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm am Sunrise Remote ELISA Reader (Tecan).

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden mindestens $1,5 \times 10^6$ Zellen in eine T75-Zellkulturflasche gesät und nach Adhärent-werden der Zellen mit Chlamydien infiziert. Zu den entsprechenden Infektionszeitpunkten wurden die Zellen zunächst mit 1 ml TriFast Trizol vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert oder gleich im Anschluss für 5 min bei RT inkubiert. Im folgenden Schritt wurden 200 μl Chloroform zugegeben, die Proben mittels Vortex gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und dann für 5 min bei 12000xg und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 500 μl Isopropanol für 10 min auf Eis, nachdem die Proben gut, mittels Invertieren, homogenisiert wurden. Nach der Zentrifugation bei 12000xg für 10 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet zwei Mal mit je 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet, oder falls nötig, für wenige Minuten bei 55°C im Heizblock erhitzt, um das gesamte Ethanol zu entfernen. Dann wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser aufgenommen und die RNA hinsichtlich ihrer

Konzentration und Reinheit am Nanodrop-Spektrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher) bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -70 °C gelagert.

3.5.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA (s. Kapitel 3.5.1) wurde im Anschluss, katalysiert durch das Enzym Reverse Transkriptase (Promega), in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese Umschreibung ermöglicht, durch die wesentlich höhere Stabilität von DNA, eine komfortablere Handhabung sowie Lagerung. Durch den Einsatz von Random Primern ist es möglich, die gesamte RNA-Sequenz in DNA umzuschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Reverse Transkription nach dem Herstellerprotokoll Reverse Transcription System Kits der Firma Promega. Ein 20 µl Ansatz wurde, wie im Folgenden beschrieben, angesetzt.

Tab. 3.18 Ansatz für die Reverse Transkription-Reaktion

Agenzen	Menge
25 mM MgCl ₂	4 µl
Reverse Transkription 10x Puffer	2 µl
10 mM dNTP Mixture	2 µl
RNasin	0,5 µl
AMV Reverse Transkriptase	15 U
0,5 µg Random Primer	1 µl
1 µg RNA	1 µl
Nuclease-freies H ₂ O	10 µl

Tab. 3.19 Temperaturprofil der Reversen Transkription

Schritt	Aktivierung	Transkription	Denaturierung	Pause
Temperatur	42 °C	42 °C	95 °C	4 °C
Zeit	10 min	30 min	5 min	∞

Die cDNA wurde im Anschluss weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

3.5.3 Semiquantitative PCR

Mittels semiquantitativer PCR ist eine Amplifizierung von DNA- und cDNA-Sequenzen im Thermozykler möglich. Dabei lagern sich spezifische Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge an, die in Folge der Denaturierung aus den DNA-Doppelsträngen hervorgegangen sind. Infolge dessen erfolgt die Initiation der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase. Dank der Thermostabilität des Enzyms, ist ein mehrmaliges Wiederholen des Zyklus möglich. Ein 20 µl PCR-Ansatz wurde, wie in der folgenden Tabelle aufgeführt, angesetzt.

Tab. 3.20 Ansatz für die semiquantitative PCR

Agenzien	Menge
5x PCR-Mix	4 µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
cDNA (100 ng)	2 µl
Nuclease-freies H ₂ O	12 µl

Tab. 3.21 Temperaturprofil der semiquantitativen PCR

Schritt	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	finale Elongation	Pause
Temperatur	94 °C	94 °C	x °C	72 °C	72 °C	4 °C
Zeit	5 min	30 s	30 s	1 min	10 min	∞
36 Zyklen						

Die PCR-Ansätze wurden mit einem Primer-spezifischen Temperaturprofil inkubiert. Nach erfolgter PCR im vollautomatischen Thermocycler, wurden je 10 µl der erhaltenen PCR-Amplifikate in einem 1 % Agarosegel, welches 0,003 % Ethidiumbromid enthielt, ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 40 V für 1,5 h durchgeführt. Als Marker kam der MassRuler DNA Ladder Mix der Firma Thermo Fisher zum Einsatz.

3.5.4 siRNA-vermittelter *Knockdown*

Durch Transfektion von Zellen mit artifizieller *short interfering RNA* (siRNA) ist es möglich, dem Prinzip der RNA-Interferenz entsprechend, Gene gezielt auszuschalten. Dabei werden mRNA-Moleküle der Zelle, durch Binden ihrer komplementären siRNA, dem enzymatischen Abbau zugeführt. Auf diese Weise erfolgt eine Herunterregulation der Expression des Zielgens auf posttranskriptionaler Ebene. Um die Effizienz des *Knockdowns* zu maximieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit jeweils vier verschiedene siRNAs pro Ansatz eingesetzt, welche eine Komplementarität zu verschiedenen Bereichen der auszuschaltenden mRNA aufwiesen.

Für die Transfektion wurden JAWSII-Zellen zunächst mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, anschließend zentrifugiert (5 min, 1300 rpm, RT) und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. 5×10^5 Zellen wurden in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 300xg und RT zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden dann in 150 µl Transfektionslösung (Mouse Dendritic Cell Nucleofactor Kit, Lonza), der die gewünschte siRNA (300 nM) zugesetzt wurde, aufgenommen. Im Falle der Kontrollen wurde AllStarRNA eingesetzt, welche sich dadurch

charakterisiert, dass sie keine Homologie zu Säugetier-mRNA aufweist. Die resuspendierten Zellen wurden in eine Nucleofactor-Küvette überführt und mit dem Programm Y-001 des NucleofactorII (Lonza) durch Elektroporation transfiziert. Nach der Transfektion wurden 500 µl Medium pro Ansatz zu den Zellen gegeben und auf 6-well-Platten verteilt. 6 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Infektion der Zellen mit Chlamydien.

Tab. 3.22 verwendete Transfektionslösung

Lösungen	Menge
Nucleofactor Solution	2,25 ml
Supplement A	0,5 ml

Die Effizienz der *Knockdowns* wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe von Western-Blot-Analysen überprüft.

3.6 Funktionaler Antigenpräsentations-Assay

Für die DC/T-Zell-Co-Kultivierungs-Experimente wurden Chlamydien-spezifische CD8⁺ T-Zellen vom Labor Dr. Knittler generiert und bereitgestellt. Die Herstellung und Isolierung dieser Zellen erfolgte mittels verschiedener immunologischer und zellbiologischer Techniken.

3.6.1 EB-Immunisierung von C57BL/6 Mäusen

Um eine starke Chlamydien-spezifische T-Zell-Antwort zu induzieren wurden 6-8 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse in mehreren Schritten immunisiert. Dafür wurden die Mäuse zunächst mit 5×10^7 IFU intraperitoneal immunisiert, gefolgt von zwei weiteren Immunisierungen an Tag 14 und Tag 28, jeweils mit 5×10^7 IFUs intraperitoneal. Nach weiteren sieben Tagen erfolgte die sogenannte *Challenge*-Infektion. Für diese wurden die Mäuse zunächst durch intraperitoneale Gabe einer Ketamin-Rompun-Lösung (Volumen in µl = Gewicht in g x 10) narkotisiert und anschließend durch intranasale Injektion von 5×10^5 IFU infiziert. Nach weiteren 14 Tagen erfolgte die Milzentnahme für die anschließende Isolation der CD8⁺ T-Zellen. Während der 14-tägigen *Challenge*-Infektion wurde das Gewicht der Mäuse jeden Tag protokolliert. Diese Arbeiten an Mäusen wurden im Rahmen von Vorarbeiten (LALLF M-V Registrierungsnummer: 7221.3-1.1-047/11, FLI-Nr.: FLI 07/11) zum Projekt von PD Dr. Michael Knittler durchgeführt.

3.6.2 Isolation von CD8⁺ T-Zellen aus der Milz

Nach der Entnahme der Milzen wurden diese zunächst in 15 ml Polystyrol-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Um die Zellen aus den Milzen freizusetzen wurden diese durchgeschnitten und mit leichtem Druck durch ein Zellsieb (70 µm) passiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde abzentrifugiert (300xg, bei 4 °C) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des CD8⁺ T cell Isolation Kit der Firma Miltenyi isoliert. Dabei wurden sämtliche nicht CD8⁺ T-Zellen mithilfe eines Antikörpergemisches von Biotin-gekoppelten Antikörpern gebunden und mit anti-Biotin-Antikörpern aus der Zellsuspension entfernt. Die Separation erfolgte durch Anlegen eines magnetischen Feldes durch den autoMACS der Firma Miltenyi. Die unmarkierten CD8⁺ T-Zellen wurden in einem Röhrchen gesammelt, in Co-Kultivierungs-Medium aufgenommen, gezählt und in einem Verhältnis von 6:1 mit dendritischen Zellen kultiviert. Um die Reinheit der isolierten T-Zellen zu bestimmen wurden diese mit einem FITC-gekoppelten anti-CD8-Antikörper angefärbt und im MACSQuant-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec) gemessen. Um eine mögliche Verunreinigung mit CD4⁺ T-Zellen auszuschließen wurden die Zellen zusätzlich auch mit einem Fluoreszenz-gekoppelten anti-CD4-Antikörper inkubiert und gemessen.

3.6.3 Co-Kultivierung dendritischer Zellen mit CD8⁺ T-Zellen

Für die Co-Kultivierungs-Assays wurden 3×10^4 JAWSII-Zellen in 200 µl Zellkulturmedium ohne Antibiotika auf 96-well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Chlamydien infiziert. Um den Einfluss bestimmter zellulärer Mechanismen und Signaltransduktionwege auf eine funktionale Antigenpräsentation zu untersuchen, wurden einige Zellen eine Stunde vor der Infektion mit spezifischen Inhibitoren und Antagonisten inkubiert. Des Weiteren wurden in einigen Zellen auch bestimmte Gene durch siRNA-Transfektion ausgeschaltet. Dafür wurden die JAWSII-Zellen 6 Stunden vor der Infektion mit der jeweiligen spezifischen siRNA wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben, transfiziert und anschließend ebenfalls mit Chlamydien infiziert. Nach 24-stündiger Infektion erfolgte die Zugabe der CD8⁺ T-Zellen. Dafür wurde die Konzentration der isolierten CD8⁺ T-Zellen auf $1,8 \times 10^5$ Zellen/200 µl Ko-Kultivierungs-Medium eingestellt. Das Medium wurde von den 96-well Platten entfernt und durch Zugabe von je 200 µl der T-Zell-Suspension ersetzt, so dass das Verhältnis von JAWSII-Zellen zu CD8⁺ T-Zellen 1:6 entsprach. Nach 48-stündiger Co-Kultivierung wurde die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen mittels IFN-γ-ELISA (3.4.10) gemessen. Für jeden Ansatz wurden dabei jeweils 4 Vertiefungen einer 96-well Platte verwendet. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm war proportional zu der im Überstand enthaltenen Menge an IFN-γ und gab Rückschlüsse auf

die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen und somit auf die funktionale Antigenpräsentation durch JAWSII-Zellen. Die Messung der kolorimetrischen Reaktion erfolgte am Sunrise Remote ELISA Reader (Tecan).

Tab. 3.23 Zusammensetzung des Co-Kultivierungs-Mediums

Agenzien	Menge
IMDM	200 ml
FCS	5 %
GM-CSF (5 ng/ml)	1 µl
β-Mercaptoethanol (50 µM)	35 µl/l

3.7 Statistische Analyse

Die Statistische Analyse der erhaltenen Daten ist als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung dreier individueller Experimente gezeigt und wurde unter Verwendung von GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) ermittelt. Die Daten wurden unter Verwendung des T-Tests sowie ANOVA (*One-Way Analysis of Variance*), gefolgt durch Dunnett's und/oder Tukey's Post Hoc Test bestimmt (n.s.: nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,01 und ***p < 0,001).

4 Ergebnisse

4.1 Mito-Xenophagosomaler Abbau chlamydialer Strukturen in DCs

Die zelluläre Immunantwort spielt aufgrund der obligat intrazellulären Lebensweise von Chlamydien eine essentielle Rolle bei der körpereigenen Abwehr dieser Bakterien. Von besonderer Bedeutung sind dabei DCs, da sie zu den ersten Antigen-präsentierenden Zellen zählen, die während einer Infektion mit Chlamydien in Kontakt treten (Gervassi et al. 2004). Verschiedene Studien deuten auf eine wichtige Funktion, der durch infizierte DCs geprimten, zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, in der anti-chlamydialen Immunantwort hin (Ojcus, Bravo de Alba, et al. 1998). In vorhergehenden Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte durch den Einsatz von C57BL/6-Mäusen, der murinen Monozyten-Zelllinie JAWSII sowie dem nicht-aviären Erreger *Chlamydia psittaci* DC15, ein Infektionsmodell etabliert werden (Dorothee Fiegl, Dissertation). Mithilfe dieses Modells gelang die Identifizierung eines Immunabwehrweges in DCs, bei welchem die Chlamydien aus strukturell desintegrierten Inklusionen dem Autophagieweg zugeführt werden und es zur Generierung von Antigenen kommt, die dann mithilfe von MHCI-Molekülen auf der DC-Zelloberfläche entsprechenden CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden (Danny Kägebein, Dissertation). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde vermutet, dass Autophagie von großer Bedeutung für die intrazelluläre Abwehr gegen Chlamydieninfektionen in DCs zu sein scheint. Erste Vorergebnisse wiesen in diesem Zusammenhang auf eine wichtige Rolle der zytosolischen Phospholipase A2 (cPLA2) hin, die während der Infektion von DCs, induziert durch TNF- α und LPS, hochreguliert sowie phosphoaktiviert wird. Die HSP25/27-abhängige Rekrutierung an das Vimentingerüst der chlamydialen Inklusionen, führte zu der Annahme, dass die von cPLA2 produzierte Arachidonsäure für die desintegrierten Inklusionen verantwortlich sein könnte. Die genauen zellulären Prozesse und proteinbiochemischen Abläufe der Desintegration chlamydialer Inklusionen sowie der anti-chlamydialen Autophagie in DCs sind bisher noch völlig unbekannt. Auch die Beteiligung anderer zellulärer Faktoren und Prozesse liegen weitestgehend im Dunkeln. Gegenstand des nachfolgenden Kapitels war es daher, den autophagosomalen Mechanismus sowie die beteiligten funktionalen Komponenten der Chlamydienbekämpfung in DCs auf zellulärer und molekularer Ebene im Detail zu untersuchen.

4.1.1 Rolle von cPLA2 beim autophagosomalen Abbau chlamydialer Strukturen in DCs

In einer vorhergehenden Forschungsarbeit konnte bereits eine infektionsabhängige Hochregulation und Phosphoaktivierung von cPLA2 gezeigt werden sowie deren HSP25/27-abhängige Rekrutierung an das Vimentingerüst der chlamydialen Inklusionen (Danny Kägebein, Dissertation). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde vermutet, dass cPLA2 eine bedeutende Rolle in der anti-chlamydialen Autophagie zukommt. Um die Beteiligung von cPLA2 an der strukturellen Auflösung der parasitophoren Vakuole (PV) sowie dem autophagosomalen Abbau von Chlamydien in DCs genauer zu untersuchen, wurde ein siRNA-vermittelter *Knockdown* des Proteins durchgeführt. Anschließend wurde der Einfluss des *Knockdowns* auf die Infektion, Autophagie sowie die Antigenpräsentation analysiert. Bevor weitere Untersuchungen folgten, wurde der *Knockdown* (KD) jedoch zunächst hinsichtlich seiner Effizienz überprüft. Dafür wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, für die DCs zunächst mit cPLA2-siRNA, sowie im Vergleich mit unspezifischer Kontroll-siRNA, transfiziert und anschließend für 48 h mit Chlamydien infiziert oder nicht weiter behandelt wurden (Abb. 4-1).

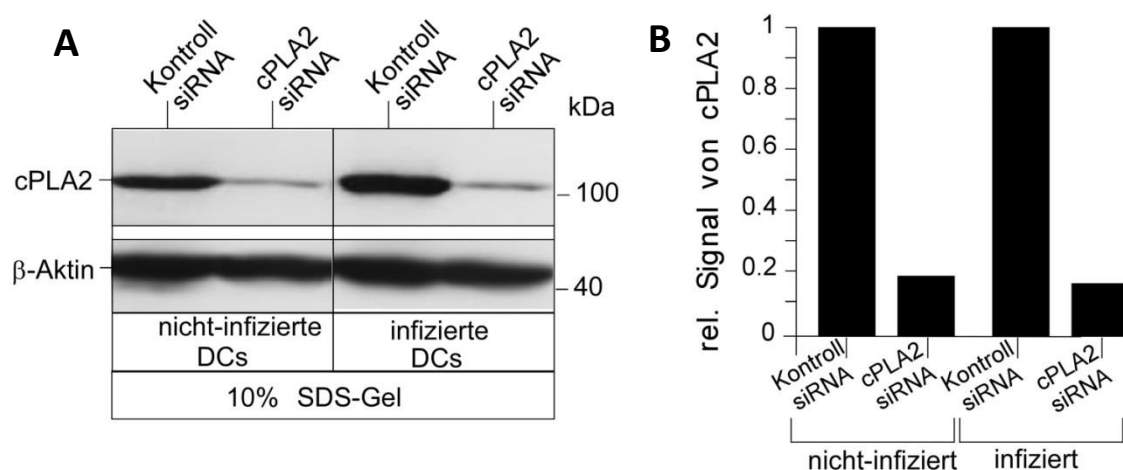


Abb. 4-1 siRNA-vermittelter *Knockdown* von cPLA2 in infizierten und nicht-infizierten DCs

(A) Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der *Knockdown*-Effizienz der cPLA2-siRNA. JAWSII-Zellen wurden mit cPLA2-siRNA transfiziert und 6 h später für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert oder nicht weiter behandelt. Als Kontrolle wurden infizierte und nicht infizierte Zellen mitgeführt, die zuvor gleichermaßen mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. (B) Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von cPLA2 zunächst auf β-Aktin normiert und anschließend die Signale für Kontroll- und cPLA2-siRNA miteinander verglichen. Dafür wurden die Bandenintensitäten der Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen jeweils auf 1 gesetzt.

Wie in Abb. 4-1 bereits visuell (A), als auch nach densitometrischer Auswertung (B) zu sehen ist, führte der cPLA2- im Vergleich zum Kontroll-siRNA-*Knockdown* sowohl in infizierten als auch in nicht-infizierten Zellen zu einer stark verminderten cPLA2-Expression. Da sich der *Knockdown* in der

Western-Blot-Analyse (Abb. 4-1) über einen Zeitraum von 48 h als stabil und sehr effizient (*Knockdown*-Effizienz $\geq 80\%$) erwies, schlossen sich im Folgenden Experimente zur Untersuchung des Einflusses des cPLA2-*Knockdowns* auf die Morphologie der chlamydialen Inklusionen sowie die Infektion der Zellen an. Dafür wurden DCs mit cPLA2-siRNA, bzw. Kontroll-siRNA transfiziert, 6 h später mit Chlamydien infiziert, anschließend mittels Immunfluoreszenz- und TEM-Analyse (48 hpi) begutachtet und letztlich die Infektion (24 und 48 hpi) durchflusszytometrisch verfolgt.

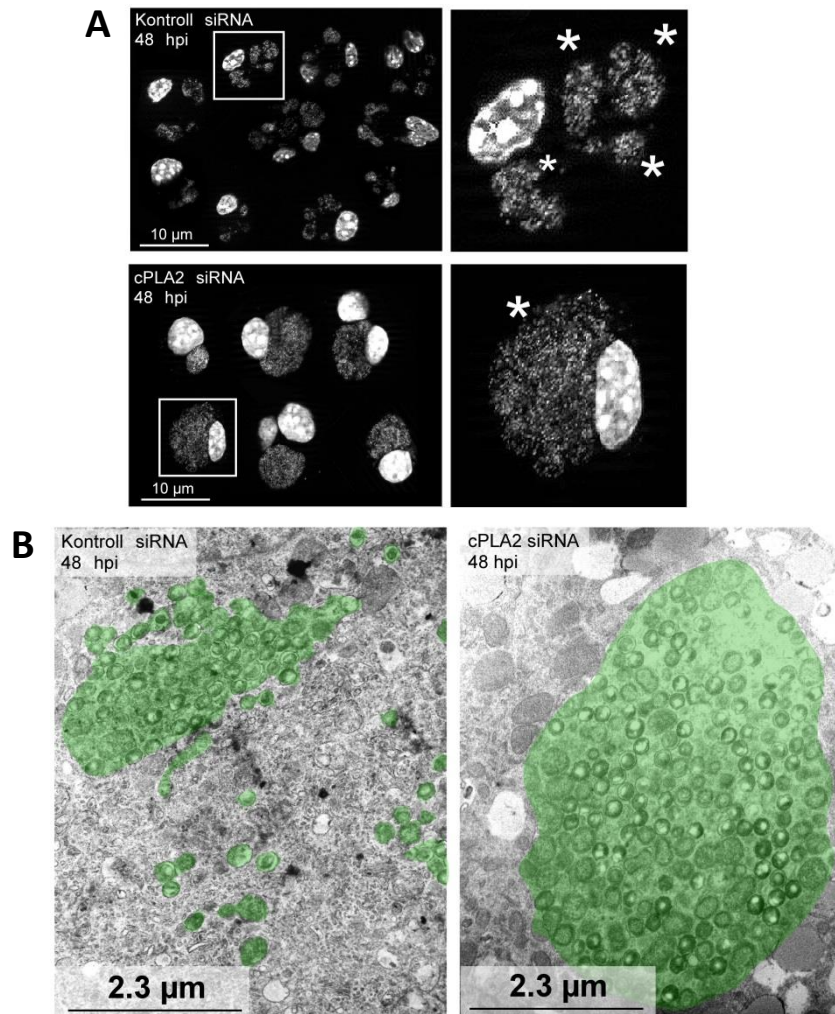


Abb. 4-2 Beteiligung von cPLA2 an der Auflösung der PV in DCs

Vergleichende Immunfluoreszenz- (A) und TEM-Analyse (B) der Morphologie der PVs in infizierten Kontroll- und cPLA2-siRNA-transfizierten DCs. JAWSII-Zellen wurden mit cPLA2- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und 6 h später für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert. (A) Dargestellt ist eine Schwarz-Weiß-Abbildung der DNA-Anfärbung (DAPI) der Zellkerne sowie der intrazellulären Chlamydien. Rechts ist ein vergrößerter Ausschnitt, des links eingerahmten Zellbereichs, zu sehen. Chlamydiale Inklusionen sind durch weiße Sterne markiert. (B) Chlamydiale Strukturen wurden nachträglich grün hinterlegt.

Sowohl in der Immunfluoreszenz- (Abb. 4-2 A) als auch in der TEM-Analyse (Abb. 4-2 B) ist ein deutlicher Unterschied in der Infektion zwischen Kontroll- und cPLA2-siRNA-transfizierten Zellen zu erkennen. Die chlamydialen Strukturen in Kontrollzellen lagen stark fragmentiert vor (Abb. 4-2 A), waren teilweise bereits zytosolisch geworden (Abb. 4-2 B) und befanden sich z.T. in ferner Distanz zum Zellkern. In cPLA2-KD-Zellen hingegen, schienen die PVs über den betrachteten Zeitraum von 48 h intakt zu bleiben und zeichneten sich zudem durch ihre enorme Größe ($\geq 10 \mu\text{m}$) und Kern-nahe Lokalisation aus. Durch den cPLA2-*Knockdown* konnte in DCs somit ein Phänotyp erzielt werden, der typisch für die Infektion von Epithelzellen, den Hauptzielzellen der Chlamydien, ist. Die Ergebnisse liefern somit einen ersten Zusammenhang zwischen der infektionsabhängigen Hochregulation der cPLA2-Expression sowie der Desintegration chlamydialer Inklusionen in DCs.

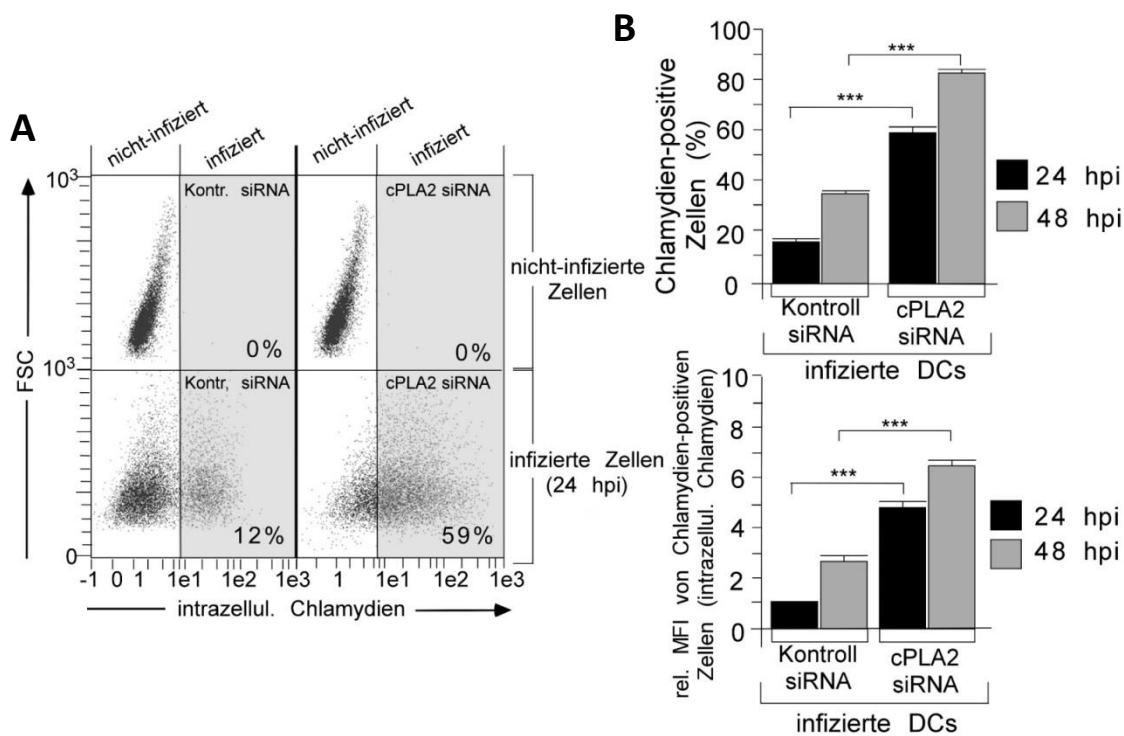


Abb. 4-3 Einfluss des cPLA2-*Knockdowns* auf die Infektion

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Chlamydien in Kontroll- und cPLA2-siRNA-transfizierten DCs. JAWSII-Zellen wurden mit cPLA2-siRNA transfiziert und 6 h später für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert oder nicht weiter behandelt. Im Anschluss wurde der Anteil infizierter Zellen bzw. intrazellulärer Chlamydien mithilfe des IMAGEN-Kits am Durchflusszytometer gemessen. (A) Repräsentative *Dotplot*-Analyse nach 24 h. Anhand der Negativkontrolle wurde das *Gate* zur Erfassung der Chlamydien-positiven Zellen ausgewählt. (B) Quantitative Analyse Chlamydien-positiver Zellen (oben) sowie intrazellulärer Chlamydien anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) (unten) 24 und 48 h nach der Infektion. Die MFI für infizierte Zellen 24 hpi wurde auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (**p<0,001 vs. Kontrolle; n=3).

Einhergehend mit der veränderten Morphologie der chlamydialen Inklusionen infolge des cPLA2-*Knockdowns* war in der Durchflusszytometrie sowohl 24 als auch 48 hpi ein starker Anstieg in der Anzahl infizierter Zellen, im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen zu beobachten (um das ca. 4- bzw. 2,2-fache), (Abb. 4-3 B oben). Durch die Bestimmung der MFI konnte zudem gezeigt werden, dass auch der Anteil an Chlamydien pro Zelle durch den *Knockdown* um das ca. 5- (24 hpi) bzw. 2-fache (48 hpi) erhöht war (Abb. 4-3 B unten). Um weiterhin Kenntnisse über die Infektiosität der Chlamydien aus cPLA2-KD-Zellen zu erhalten, wurden Reinfektions-Studien mit BGM-Zellen durchgeführt. Bei BGM-Zellen handelt es sich um eine Epithelzelllinie, die für die standardisierte Anzucht von Chlamydien eingesetzt wird. Für den Reinfektionsassay wurden cPLA2- und Kontroll-siRNA-transfizierte DCs für 48 h mit Chlamydien infiziert. Anschließend wurden die Zellen mittels Sonifikation homogenisiert und verschiedene Volumina, der im Zellhomogenat enthaltenen Chlamydien, zu BGM-Zellen titriert. 24 hpi wurde die Infektion am Durchflusszytometer untersucht (Abb. 4-4).

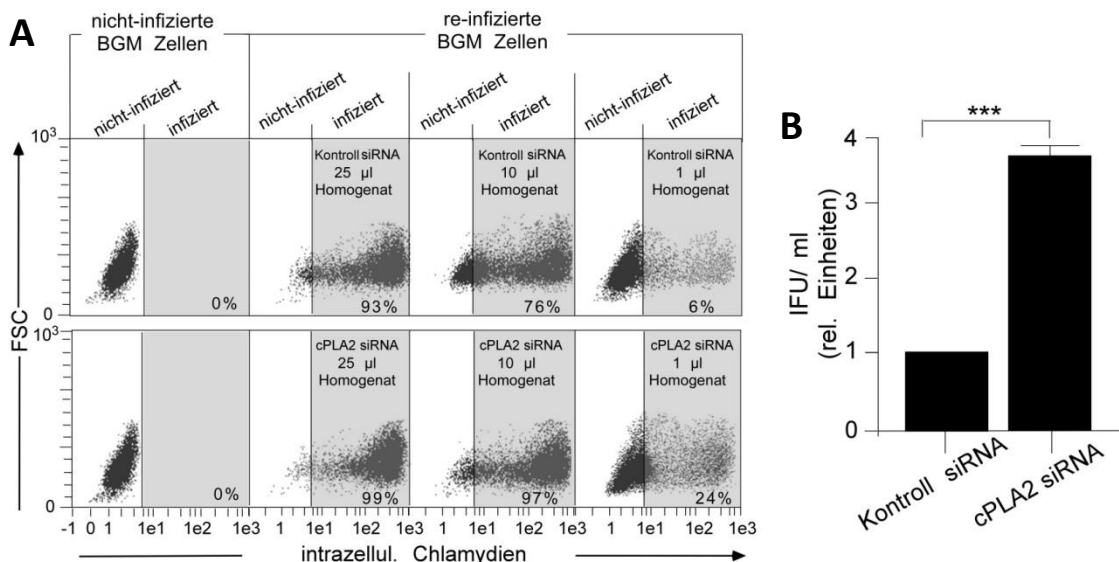


Abb. 4-4 Einfluss des cPLA-Knockdowns auf die Infektiosität der Chlamydien

Reinfektionsassay von BGM-Reporterzellen. JAWSII-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. cPLA2-siRNA transfiziert und 6 h später für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert. Anschließend wurden Zellhomogenate durch Ultraschallbehandlung der Zellen hergestellt und in unterschiedlichen Volumina (25, 10 und 1 µl) für die Infektion von BGM-Zellen eingesetzt. Der Anteil infizierter BGM-Zellen wurde unter Verwendung des IMAGEN-Kits am Durchflusszytometer gemessen. (A) *Dotplot*-Analyse. Anhand der Negativkontrolle wurde das *Gate* zur Erfassung der Chlamydien-positiven Zellen ausgewählt. (B) Quantitative Darstellung der aus A berechneten *infection forming units/ml* (IFU/ml) für 1 µl eingesetztes Homogenat. Die IFU/ml für Kontroll-siRNA-behandelte Zellen wurde auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (***) $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n=3$).

Wie in Abb. 4-4 ersichtlich, enthalten cPLA2-KD-Zellen deutlich mehr infektiöse Chlamydien als Kontroll-KD-Zellen, was sich in einer erhöhten Anzahl infizierter BGM-Zellen widerspiegelt. Dies wird bereits bei einem Titrationsvolumen an Zellhomogenat von 10 µl sichtbar, am deutlichsten zeigte sich dies jedoch bei einem Volumen von 1 µl. Für letzteres Titrationsvolumen war sowohl der Anteil infizierter Zellen (Abb. 4-4 A) als auch die sich daraus ergebende IFU/ml (Abb. 4-4 B) nach Behandlung mit Zellhomogenaten von cPLA2-, im Vergleich zu Kontroll-KD-Zellen, um den Faktor 4 erhöht. Folglich enthalten cPLA2-KD-Zellen deutlich mehr infektiöse EBs als Kontroll-KD-Zellen. Dies kann damit zusammenhängen, dass in cPLA2-KD-Zellen ein reduzierter Abbau der Chlamydien mittels Autophagie stattfindet, die Bakterien infolge dessen ihren Infektionszyklus vollständig durchlaufen können und somit auch die Redifferenzierung in infektiöse EBs erfolgt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Folgenden der Einfluss des cPLA2-*Knockdowns* auf die Autophagie untersucht. Dafür wurden DCs mit Kontroll- bzw. cPLA2-siRNA transfiziert, für 24 und 48 h mit Chlamydien infiziert und anschließend mittels Durchflusszytometrie die Autophagieinduktion untersucht. Für diese Untersuchung kam das, bereits in vorherigen Arbeiten verwendete, *Cyto-ID*-Kit zum Einsatz (Danny Kägebein, Dissertation), welches einen *cationic amphiphilic tracer* (CAT) Farbstoff enthält, der in Zellen diffundiert und so konzipiert ist, dass er lediglich in autophagosomalen Kompartimenten akkumuliert, nicht jedoch in Endo- und/oder Lysosomen (Abb. 4-5).

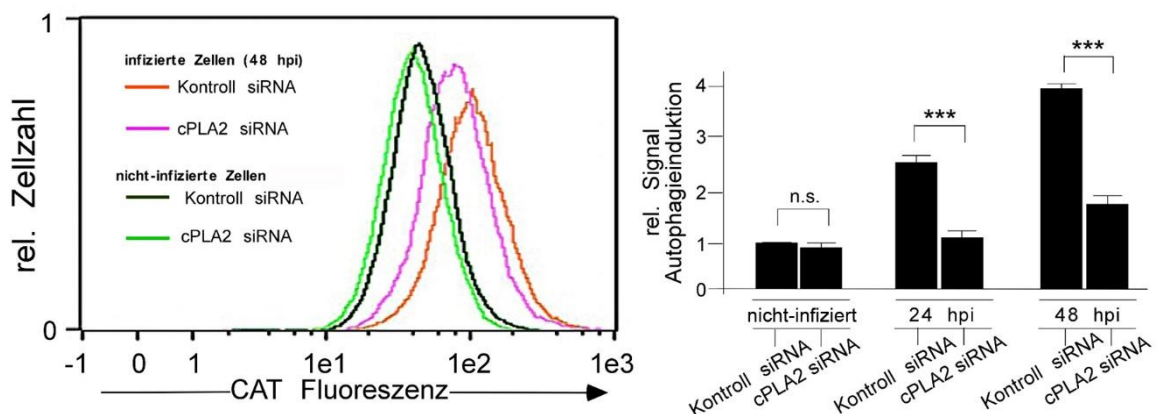


Abb. 4-5 Einfluss des cPLA2-*Knockdowns* auf die Autophagie infizierter DCs

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Messung der Autophagie-Induktion nach Infektion von cPLA2- und Kontroll-siRNA-transfizierten DCs. JAWSII-Zellen wurden mit cPLA2- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und 6 h später mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert oder blieben unbehandelt. 24 und 48 hpi erfolgte die Messung der Autophagie-Induktion mittels Cyto-ID-Kit am Durchflusszytometer. (A) Repräsentative Analyse der Autophagie-Induktion nach 48 h. (B) Mittelwerte der MFI aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Die MFI für nicht infizierte Kontroll-siRNA transfizierte JAWSII-Zellen wurde auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (n.s.: nicht signifikant, ***p < 0,001 vs. Kontrolle; n=3).

Abb. 4-5 zeigt, dass der *cPLA2-Knockdown* sowohl 24 als auch 48 h nach der Infektion von DCs zu einer stark reduzierten Autophagieinduktion führt. Während die Autophagie in Kontroll-KD-Zellen im Laufe der Infektion um den Faktor 3,8 anstieg, war für *cPLA2-KD*-Zellen nur eine Autophagieinduktion um das 1,7-fache nach 48 h Infektion zu verzeichnen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das *cPLA2*-vermittelte Aufbrechen der chlamydialen Inklusionen erforderlich ist, um die folgende Degradation mittels Autophagie zu ermöglichen. Daraus ergab sich die Frage, ob und in welchem Maße sich der *cPLA2-Knockdown* auch auf die funktionale Antigenpräsentation von DCs auswirkt. Um dies zu untersuchen, wurde ein Co-Kultivierungsassay mit infizierten *cPLA2*- bzw. Kontroll-KD DCs und CD8⁺ T-Zellen aus immunisierten und infizierten C57BL/6-Mäusen durchgeführt (Fiegl, 2012). Dafür wurden DCs zunächst mit *cPLA2*- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert, anschließend mit Chlamydien infiziert und 24 h später mit Chlamydien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen co-kultiviert. Weitere 48 h später wurde dann die funktionale Antigenpräsentation, als Maß für die Stimulierung der T-Zellen durch Antigen-präsentierende DCs, anhand der IFN- γ -Sekretion von T-Zellen mittels ELISA gemessen. Als Kontrollen wurden außerdem infizierte, nicht infizierte DCs sowie anti-CD3-/CD28-konjugierte Dynabeads mit Chlamydien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen co-kultiviert (Abb. 4-6).

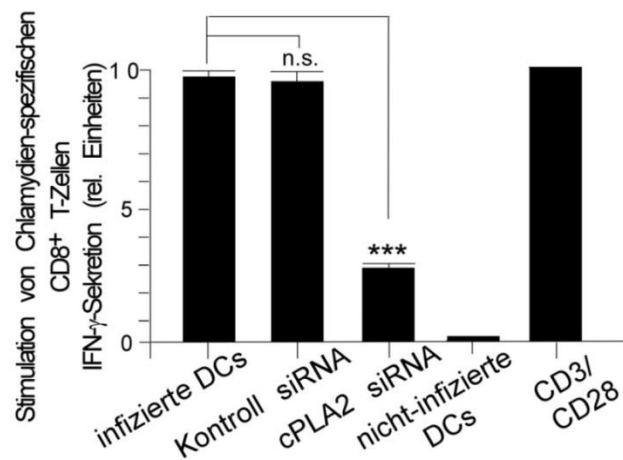


Abb. 4-6 T-Zellaktivierung nach *cPLA2-Knockdown*

Dargestellt ist die relative IFN- γ -Sekretion Chlamydien-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach 48 h Co-Kultivierung mit Kontroll- bzw. *cPLA2*-siRNA-transfizierten DCs. JAWSII-Zellen wurden mit *cPLA2*- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und 6 h später mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert. 24 hpi erfolgte die Zugabe der CD8⁺ T-Zellen in einem Verhältnis von DCs:T-Zellen von 1:6. Nach 48 h Co-Kultivierung wurde die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen mittels IFN- γ -ELISA gemessen. Als Positivkontrolle wurden CD8⁺ T-Zellen mit anti-CD3-/CD28-konjugierten Dynabeads kultiviert. Die IFN- γ -Sekretion ist dargestellt als relative Einheit, wobei die Positivkontrolle auf 10 gesetzt wurde. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (n.s.: nicht signifikant, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n = 3$).

Wie in Abb. 4-6 zu sehen, führten infizierte DCs, ähnlich wie anti-CD3-/CD28-konjugierte Dynabeads (Positivkontrolle) zu einer massiven Stimulation (IFN- γ -Sekretion) Chlamydien-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Für cPLA2-KD-DCs hingegen war die Fähigkeit zur T-Zellstimulation im Vergleich zu Kontroll-KD-DCs um das ca. 3,3-fache reduziert. cPLA2 kann demnach eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Antigenpräsentation während der Chlamydieninfektion von DCs zugeschrieben werden. Zusammenfassend deuten die Daten zum cPLA2-*Knockdown* auf eine Schlüsselrolle von cPLA2 in der anti-chlamydialen Abwehr von DCs hin, da das Protein offensichtlich eine essentielle Funktion in der Desintegration der PV hat und somit erst einen Abbau der chlamydialen Strukturen mittels Autophagie, sowie die autophagosomale Prozessierung chlamydialer Antigene ermöglicht.

4.1.2 Wirkung von Arachidonsäure auf Chlamydien-infizierte DCs

Da cPLA2 die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus Phospholipidmembranen katalysiert (Dennis et al. 2011), war die Vermutung naheliegend, dass diese für die Desintegration der chlamydialen Inklusionen in DCs verantwortlich sein könnte. Es ist bekannt, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie u.a. Linolsäure, α -, γ -Linolensäure und Eicosapentaensäure, eine anti-mikrobielle Wirkung zeigen (Das 2018). Arachidonsäure scheint darunter die größte anti-bakterielle Aktivität aufzuweisen und hat sich als effektiv gegen gram-positive sowie -negative Bakterien (Nieman 1954, Kabara et al. 1972, Larsson, Noren, and Odham 1975, Heczko et al. 1979), Pilze (Prince 1959) sowie umhüllte Viren (Sands, Auperin, and Snipes 1979, Kohn, Gitelman, and Inbar 1980) erwiesen. Ein Forschungsbericht der Universität Bonn gab erste Hinweise auf infektionsreduzierende Eigenschaften von Arachidonsäure während der Chlamydieninfektion in Epithelzellen (Sauerwein 2012). Vorstudien unserer Arbeitsgruppe konnten zudem für DCs zeigen, dass die externe Behandlung der Zellen mit Arachidonsäure zu einer starken Reduktion der Infektion (reduzierte Expression von chlamydialem HSP60, sowie verminderte Anzahl infizierter Zellen) führte. Dieser Effekt war bereits visuell im Fluoreszenzmikroskop daran zu erkennen, dass die in DCs ohnehin schon fragmentiert vorliegenden chlamydialen Strukturen wesentlich fragmentierter vorlagen ($\leq 1 \mu\text{m}$) und zum Teil nicht mehr detektierbar waren (Radomski, Kagebein, et al. 2017). Arachidonsäure kann auf unterschiedlichen Ebenen anti-bakteriell wirken. Zum einen kann sie die bakteriellen Zellmembranen angreifen oder lysieren (Davis and Silbert 1974, Galbraith and Miller 1973), zum anderen ist sie in der Lage, verschiedene zelluläre metabolische Effekte zu entfalten, wie die Inhibition der Respirationsaktivität, des Aminosäure-Transports und die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (Sheu, Konings, and Freese 1972, Ingram et al. 1982, Fay and Farias 1977, Coonrod, Lester, and Hsu 1984). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die bereits gezeigten anti-chlamydialen Effekte einem

direkten Einfluss von Arachidonsäure auf chlamydiale EBs zugrunde liegen. Dafür wurden zum einen EBs direkt für 8 h mit Arachidonsäure vorbehandelt und anschließend für die Infektion von DCs eingesetzt, zum anderen wurden DCs 8 h mit Arachidonsäure vorbehandelt und nachfolgend mit Chlamydien infiziert. Der Grad der Infektion wurde anhand der Expression von chlamydialem HSP60 im Western-Blot vergleichend analysiert (Abb. 4-7).

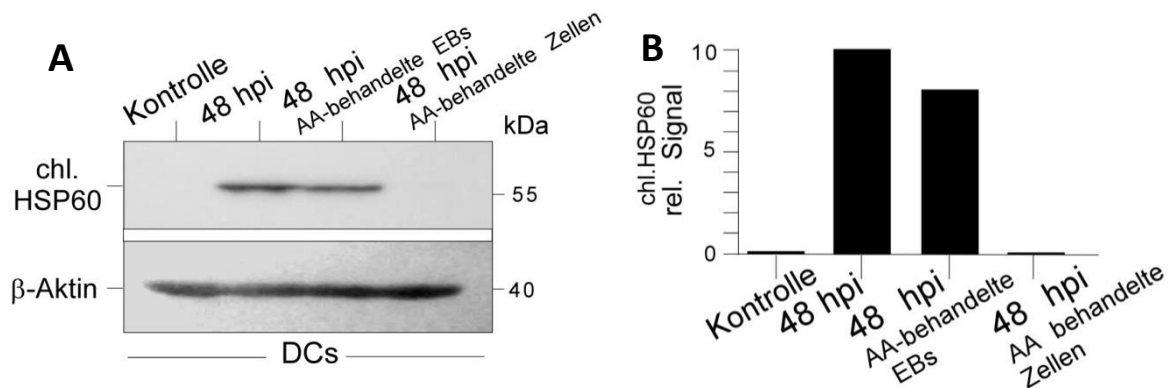


Abb. 4-7 Effekt von Arachidonsäure

(A) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Wirkung von Arachidonsäure auf die Chlamydieninfektion von DCs. JAWSII-Zellen bzw. EBs (*C. psittaci*) wurden für 8 h mit 100 μ M Arachidonsäure vorbehandelt. Anschließend wurden die EBs in einer MOI von 10 für die Infektion eingesetzt bzw. die AA-vorbehandelten JAWSII-Zellen mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert. Für die Dokumentation der Infektion wurde die Expression von chlamydialem HSP60 untersucht. Als Ladekontrolle der untersuchten Zelllysate diente β -Aktin. (B) Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von HSP60 zunächst auf β -Aktin normiert und anschließend die Signale miteinander verglichen. Dafür wurde die Bandenintensität infizierter JAWSII-Zellen auf 10 gesetzt.

Wie in Abb. 4-7 deutlich zu sehen, führte die Vorbehandlung von DCs mit Arachidonsäure, wie bereits in vorhergehenden Arbeiten gezeigt (Danny Kägebein, Dissertation), zu einer deutlichen Reduktion der Bandenintensität von chlamydialem HSP60. Durch die Vorbehandlung von EBs mit Arachidonsäure konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden. Hier war im Vergleich zur herkömmlichen Infektion, nur eine minimale Reduktion der Bandenintensität von chlamydialem HSP60 zu verzeichnen. Somit sprechen die Resultate gegen einen direkten Einfluss von Arachidonsäure auf die Viabilität/Infektiosität der Chlamydien.

4.1.3 Beeinträchtigung von Mitochondrien während der Infektion von DCs

Im vorangegangenen Kapitel konnte bereits ein direkter Einfluss von Arachidonsäure auf die Viabilität der Chlamydien ausgeschlossen werden. Wie bereits erwähnt, kann Arachidonsäure jedoch die physikalischen Eigenschaften sowie die Dynamik verschiedener subzellulärer Membranen, wie z.B. Mitochondrienmembranen, verändern. Dabei agiert sie als Entkoppler des mitochondrialen Membran- und pH-Gradienten, indem sie die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran erhöht (Zhu et al. 2006, Di Paola et al. 2006). Dies hat eine Schädigung der Mitochondrien und damit einhergehend eine defekte oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) sowie ATP-Produktion zur Folge (Hillered and Chan 1988). Für verschiedene intrazelluläre Bakterien konnte eine Abhängigkeit von mitochondrialen Energie- und Nährstoffspeichern gezeigt werden (Winkler and Neuhaus 1999). Die Infektion von Epithelzellen mit *C. psittaci* und *C. trachomatis* zeichnet sich u.a. durch die Rekrutierung von Mitochondrien zur chlamydialen Inklusion aus (Matsumoto et al. 1991, Escalante-Ochoa et al. 1999). Auch für die Infektion von DCs mit *C. psittaci* konnte im Rahmen dieser Arbeit, mithilfe von TEM-Analysen, eine enge Assoziation, der innerhalb der Inklusion befindlichen sowie bereits zytosolisch gewordenen Chlamydien zu Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 4-8). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Inhibition der OXPHOS durch Antimycin A zu einer starken Beeinträchtigung der Entwicklung und des Metabolismus von Chlamydien führt (Szaszak et al. 2011, Ying et al. 2008), was die Annahme zulässt, dass die Pathogene essentiell auf die Energieversorgung durch Mitochondrien angewiesen sind. Käme es im Laufe der DC-Infektion, verursacht durch die Wirkung von Arachidonsäure, zu einer defekten OXPHOS und verminderten ATP-Produktion der Mitochondrien, hätte dies also verheerende Folgen für die ATP-/energieparasitären Chlamydien.

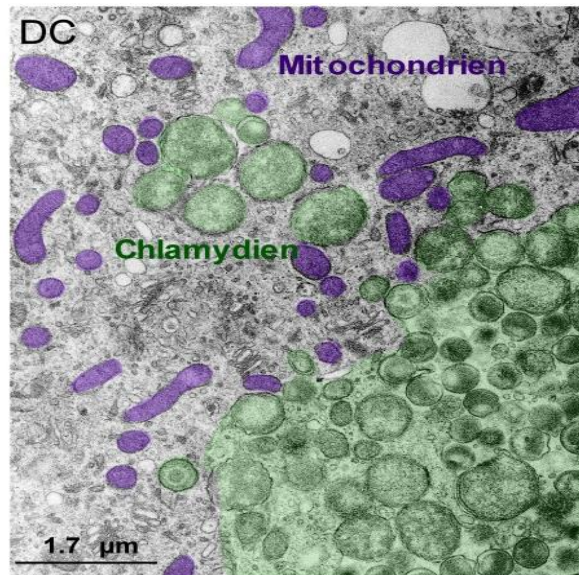


Abb. 4-8 Assoziation von Chlamydien mit Mitochondrien in DCs

TEM-Aufnahme einer Chlamydien-infizierten JAWSII-Zelle. Chlamydiale Strukturen wurden artifiziell in grün, Mitochondrien in blau eingefärbt.

Um zu untersuchen, ob es während der Chlamydieninfektion von DCs tatsächlich zu einer Entkopplung des mitochondrialen Membranpotenzials kommt, schlossen sich zunächst Experimente zur Vitalität der Mitochondrien über den Infektionsverlauf von 72 h an. Dafür kamen zum einen immunfluoreszenzmikroskopische Analysen mit dem mitochondrialen Farbstoff Mitotracker Red CMXRos (Cell Signaling) zum Einsatz, welcher ausschließlich Mitochondrien mit intaktem Membranpotenzial anfärbt (Abb. 4-9 A), zum anderen wurden die Zellen auf die mögliche Akkumulation von Pink-1, einem Markerprotein für geschädigte Mitochondrien, hin untersucht (Abb. 4-9 B). Zudem erfolgte unter Verwendung des JC-1-Kits, welches Mitochondrien, basierend auf intaktem oder geschädigtem Membranpotenzial rot bzw. grün anfärbt, die Bestimmung des Verhältnisses intakter/geschädigter Mitochondrien im Infektionsverlauf mittels Durchflusszytometrie (Abb. 4-9 C).

Ergebnisse

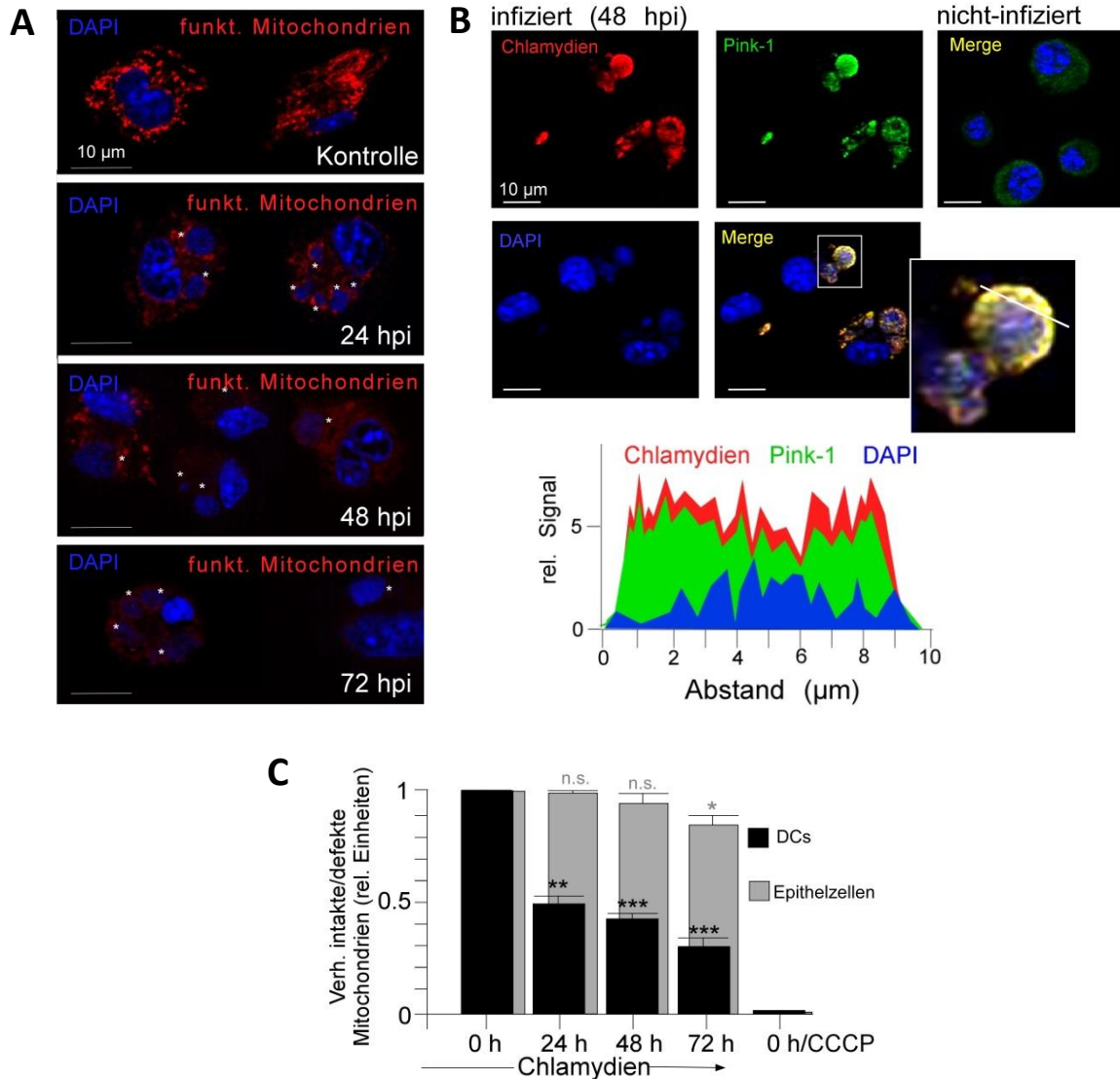


Abb. 4-9 Verlust funktionaler Mitochondrien während der Infektion von DCs

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *C. psittaci* (MOI 10) infizierten JAWSII-Zellen unter Verwendung des mitochondrialen Farbstoffs Mitotracker (rot) und DAPI (blau). Chlamydiale Inklusionen sind durch einen Stern gekennzeichnet. (B) Immunfluoreszenz-Analyse der Co-Lokalisation von Pink-1 (grün) mit Chlamydien (rot); DAPI (blau) (oben). Überlagerung der ermittelten Fluoreszenzintensitäten entlang des oben vergrößert dargestellten zellulären Querschnitts (ImageJ) (unten). (C) Durchflusszytometrische Analyse Chlamydien-infizierter JAWSII- und MN-R-Zellen unter Verwendung des JC-1-Kits. Dargestellt sind die relativen Verhältnisse intakter (JC-1-Oligomer)/geschädigter (JC-1-Monomer) Mitochondrien als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die nicht infizierte Kontrolle wurde dabei auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (n.s.: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n=3$). CCCP (50 μ M), ein mitochondrialer Entkoppler, wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Wie in Abb. 4-9 A ersichtlich, konnten in nicht-infizierten DCs intakte Mitochondrien nachgewiesen werden. Während des Infektionsverlaufs kam es jedoch zu einer starken Reduktion der Mitotracker-Anfärbung, was ein erstes Indiz für eine Beeinträchtigung des mitochondrialen Membranpotenzials während der Infektion lieferte. Weitere Immunfluoreszenz-Analysen infizierter DCs konnten darüber hinaus zeigen, dass Pink-1, 48 hpi stark in der Zelle akkumulierte und außerdem mit chlamydialen Strukturen co-lokalisierte (Abb. 4-9 B). Diese Beobachtung bestätigte zum einen die Beeinträchtigung von Mitochondrien während des Infektionsverlaufs, zum anderen war durch die Akkumulation von Pink-1 ein erster Hinweis auf einen anschließenden Abbau der Mitochondrien mittels Mitophagie gegeben. In Einklang zu den vorherigen Ergebnissen, konnte durch den Einsatz des JC-1-Kits und der Bestimmung des Verhältnisses von intakten/defekten Mitochondrien gezeigt werden, dass dieses während der Infektion von DCs massiv abnahm (Abb. 4-9 C). Eine ähnliche Abnahme war durch die Behandlung der Zellen mit CCCP, einem mitochondrialen Entkoppler, der als Positivkontrolle eingesetzt wurde, zu verzeichnen. Der Verlust an Mitochondrien mit intaktem Membranpotenzial war dabei spezifisch für infizierte DCs; in infizierten Epithelzellen blieb das Verhältnis von intakten/defekten Mitochondrien über den beobachteten Infektionsverlauf nahezu konstant. Insgesamt sprechen die Daten somit eindeutig für eine starke Beeinträchtigung des mitochondrialen Membranpotenzials und damit einhergehend der Vitalität der Mitochondrien in Chlamydien-infizierten DCs. Es stellte sich nun die Frage, durch welche Signalwege es zum Erliegen des mitochondrialen Membranpotenzials kommt, und ob tatsächlich die durch cPLA2 freigesetzte Arachidonsäure für diesen Effekt verantwortlich ist. Um dies zu entschlüsseln, wurden DCs nicht infiziert, sondern stattdessen mit Arachidonsäure (Abb. 4-10 A) oder TNF- α (Abb. 4-10 B) behandelt. Für letzteres konnte bereits in vorhergehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe sowie weiteren Studien gezeigt werden, dass es über die Phosphorylierung der Proteinkinasen p38 und ERK1/2, zur Phosphoaktivierung von cPLA2 führt (Danny Kägebein, Dissertation) (Liu and McHowat 1998, Waterman et al. 1996). Die behandelten Zellen wurden mit dem bereits erwähnten JC-1-Kit angefärbt und das Verhältnis von intakten/defekten Mitochondrien über einen Zeitverlauf von 72 h bestimmt (Abb. 4-10).

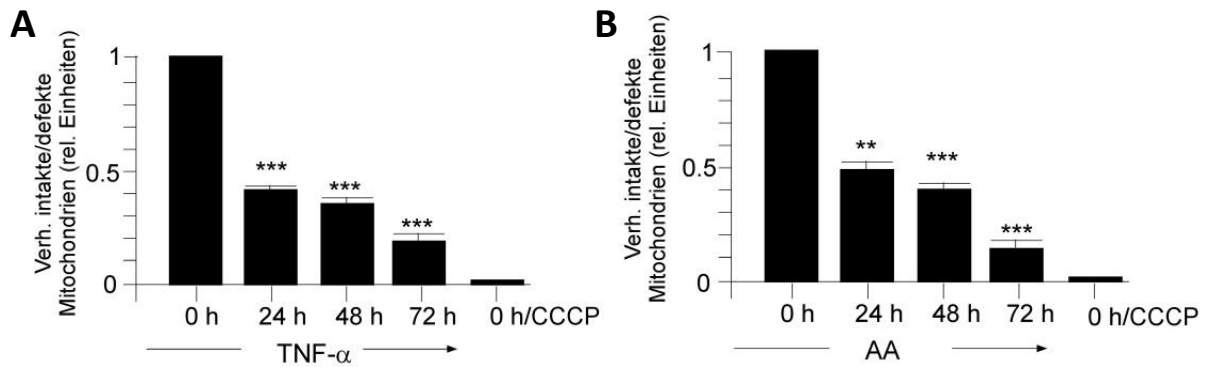


Abb. 4-10 Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials wird kontrolliert durch den TNF- α /cPLA2/AA-Signalweg

Durchflusszytometrische Analyse von TNF- α - (30 ng/ml) (A) und AA- (100 μ M) (B) behandelten JAWSII-Zellen. Dargestellt sind die relativen Verhältnisse intakter (JC-1-Oligomer)/geschädigter (JC-1-Monomer) Mitochondrien als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die nicht behandelte Kontrolle wurde dabei auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (**: $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n = 3$). CCCP (50 μ M) wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Wie in Abb. 4-10 zu sehen, konnte sowohl durch die Behandlung von DCs mit TNF- α als auch mit Arachidonsäure eine Reduktion des Verhältnisses von intakten/defekten Mitochondrien beobachtet werden, wie es bereits für die Chlamydieninfektion gezeigt wurde (Abb. 4-9 C). Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials scheint demnach durch den TNF- α /cPLA2/AA-Signalweg kontrolliert zu werden.

4.1.4 Metabolische Umprogrammierung von DCs während der Infektion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es im Infektionsverlauf von DCs zu einer starken Beeinträchtigung des Membranpotenzials der Mitochondrien kommt und dass dies, durch den TNF- α /cPLA2/AA-Signalweg induziert zu werden scheint (s. Kapitel 4.1.3), stellte sich im Folgenden die Frage, was im Weiteren mit den defekten Mitochondrien geschieht. Mitochondrien sind die Hauptproduzenten schädlicher reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen. Nicht mehr funktionale Mitochondrien mit einem zerstörten Membranpotenzial und einer unterbrochenen ATP-Synthese zeichnen sich durch eine erhöhte ROS-Produktion aus (Sun et al. 2016, Zorov, Juhaszova, and Sollott 2014). Ein Mechanismus der Zelle, die ROS-Produktion und damit die Mitochondrien-vermittelte Apoptose zu reduzieren, ist die Eliminierung geschädigter Mitochondrien mittels Autophagie (=Mitophagie) (Bin-Umer et al. 2014, Kurihara et al. 2012). Ein erster Hinweis auf einen Abbau defekter Mitochondrien mittels Mitophagie war bereits durch die Akkumulation von Pink-1 während

Ergebnisse

der Infektion von DCs gegeben (Abb. 4-9 B), da dieses Protein im Rahmen der Mitophagie zur Aktivierung der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin führt und für deren Rekrutierung zu defekten Mitochondrien verantwortlich ist (Matsuda et al. 2010). Um genauer zu untersuchen, ob die defekten Mitochondrien in Chlamydien-infizierten DCs autophagosomal abgebaut werden, wurden zum einen Western-Blot-Analysen zur Untersuchung der Expression von mitochondrialem HSP60 (Abb. 4-11 A), zum anderen Analysen zur ROS-Produktion von DCs im Infektionsverlauf durchgeführt (Abb. 4-11 B). Parallel wurde der Anteil nekrotischer und apoptotischer Zellen während der Infektion mittels Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 4-11 C).

Ergebnisse

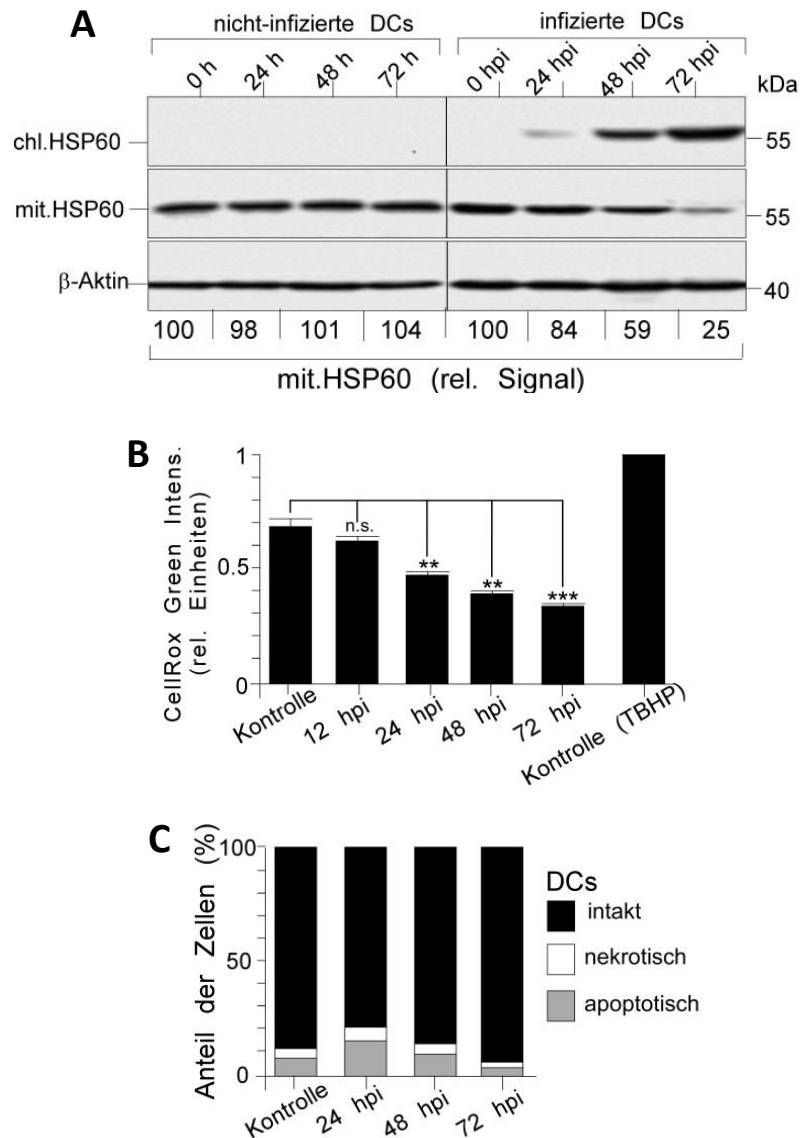


Abb. 4-11 Degradation geschädigter Mitochondrien mittels Mitophagie

(A) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression von chlamydialem (chl.) und mitochondrialem (mit.) HSP60 in *C. psittaci* (MOI 10) infizierten und nicht-infizierten JAWSII-Zellen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Die durch densitometrische Analyse nach Normalisierung auf β -Aktin erhaltenen Bandenintensitäten für mitochondriales HSP60, sind unterhalb der entsprechenden Bande aufgeführt. (B) Durchflusszytometrische Messung der ROS-Produktion infizierter JAWSII-Zellen unter Verwendung des cellROX Green-Farbstoffs. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. TBHP-behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle und wurden auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (n.s.: nicht signifikant, **: $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n=3$). (C) Durchflusszytometrische Analyse nekrotischer und apoptotischer JAWSII-Zellen während der Infektion unter Einsatz des Annexin-V-FITC-Kits sowie Propidiumiodid.

Wie in Abb. 4-11 A deutlich zu sehen, kam es im Infektionsverlauf von DCs zu einer starken Reduktion der Bandenintensität für mitochondriales HSP60. 72 hpi war das Signal für mitochondriales HSP60, im Vergleich zu dem der nicht-infizierten Kontrolle, um ein 4-faches reduziert. Für nicht infizierte Zellen

hingegen blieb das Signal über den gesamten Untersuchungszeitraum relativ konstant. Die Untersuchung der ROS-Produktion hat weiterhin gezeigt, dass diese nicht, wie für geschädigte Mitochondrien zu erwarten, während des Infektionsverlaufs zunahm, sondern innerhalb der 72 h circa um die Hälfte reduziert war (Abb. 4-11 B). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es im Zuge der Infektion weder zu einer nennenswerten Erhöhung der Apoptose, noch der Nekrose kommt (Abb. 4-11 C). Folglich scheinen DCs ihr Überleben während der Infektion zu sichern, indem sie die defekten Mitochondrien dem mitophagosomalen Abbau zuführen. Damit entgehen sie zwar einer erhöhten ROS-Produktion und Apoptose von Seiten der Mitochondrien, gleichzeitig zieht die Degradation der Mitochondrien jedoch auch einen extremen Energieverlust durch das Ausbleiben der OXPHOS mit sich. Dies warf die Frage auf, wie bzw. ob DCs den Verlust der mitochondrialen Energieversorgung während der Infektion kompensieren können. Für DCs ist beschrieben, dass deren funktionelle Reifung mit einer metabolischen Umprogrammierung von der OXPHOS zur aeroben Glykolyse einhergeht (Pantel et al. 2014, Krawczyk et al. 2010). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob diese Umprogrammierung des Metabolismus auch während der Chlamydieninfektion stattfindet und somit für das Überleben der DCs verantwortlich sein könnte. Dafür wurde die L-Lactatkonzentration mithilfe eines kolorimetrischen Tests als Maß für die aerobe Glykolyse in infizierten DCs (48 hpi) bestimmt (Abb. 4-12 A). Als Positivkontrolle wurden zudem Zellen mitgeführt, welche für 48 h mit TNF- α oder Arachidonsäure inkubiert wurden. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung des ATP-Gehalts infizierter DCs, mithilfe eines weiteren kolorimetrischen Tests, über einen Infektionszeitraum von 72 h (Abb. 4-12 B).

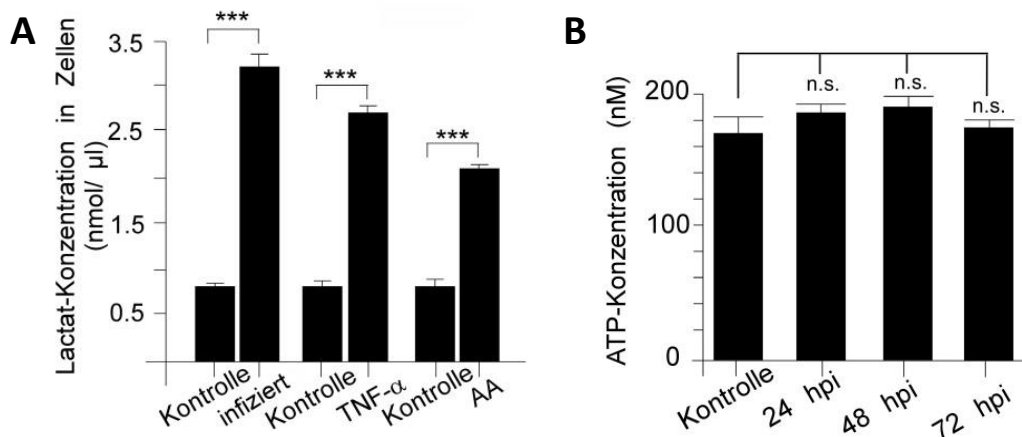


Abb. 4-12 Metabolische Umprogrammierung von DCs während der Infektion

(A) Bestimmung der Lactat-Konzentration in *C. psittaci*-infizierten (MOI 10), TNF- α - (30 ng/ml) oder AA- (100 μ M) behandelten JAWSII-Zellen nach 48 h Inkubation mittels L-Lactat-Assay Kit. (B) Messung der ATP-Level Chlamydien-infizierter JAWSII-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (n.s.: nicht signifikant, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n = 3$).

Abb. 4-12 A zeigt die gemessene Lactatkonzentration in Chlamydien-infizierten, TNF- α - und AA-behandelten DCs, im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen. Bei der Analyse der Lactatkonzentration TNF- α - und Arachidonsäure-behandelter Zellen ist ein deutlicher Anstieg um den Faktor 3,5 bzw. 2,8 zu verzeichnen. Ein sogar noch stärkerer Effekt wurde durch die 48 h Infektion von DCs erreicht (Faktor 4,5). Die Untersuchung des ATP-Gehalts hat weiterhin gezeigt, dass es im Infektionsverlauf von DCs zu keiner signifikanten Veränderung der ATP-Konzentration kommt (Abb. 4-12 B). Für alle Infektionszeitpunkte sowie die Kontrolle lag der ATP-Gehalt der Zellen zwischen 170 nM und 185 nM. Zusammen lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die Chlamydieninfektion mit einer metabolischen Umprogrammierung von der OXPHOS zur aeroben Glykolyse in DCs einhergeht. Durch die erhöhte Glykolyserate scheinen die Zellen demnach, den durch die geschädigten und abgebauten Mitochondrien zustande kommenden Energieverlust, komplett kompensieren zu können.

4.1.5 Deacetylierung von α -Tubulin und funktionale Rolle von HDAC6

Im vorherigen Kapitel konnte bereits gezeigt werden, dass es während der Infektion von DCs zu einer metabolischen Umprogrammierung und damit einhergehend zu einer Degradation der Mitochondrien mittels Mitophagie kommt. Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob der Verlust an Energie- und Nährstoffen von Seiten der Mitochondrien allein für eine negative Beeinflussung der Chlamydienentwicklung ausreicht. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob es im Laufe der Infektion noch zu anderweitigen Beeinträchtigungen in der Nährstoffzufuhr der Chlamydien kommt. Neben Mitochondrien spielt insbesondere der Golgi-Apparat eine bedeutende Rolle für die Versorgung der parasitophoren Vakuole mit Nährstoffen und Lipiden von Seiten der Wirtszelle (McClarty 1994, Heuer et al. 2009). Für Epithelzellen wurde gezeigt, dass reife chlamydiale Inklusionen bereits 2 h nach Eintritt der Bakterien in die Zelle, entlang von Mikrotubuli, zum Mikrotubuli organisierenden Zentrum (MTOC) wandern (Grieshaber, Grieshaber, and Hackstadt 2003). Dort nehmen sie eine peri-nukleäre Lokalisation in der Nähe des Golgi-Apparates ein, wo sie mit der Rekrutierung von Sphingolipiden und Cholesterol aus dem trans-Golgi-Netzwerk und den *multivesicular elements* des Wirtes beginnen (Hackstadt et al. 1997). Ab ca. 12 hpi wird die chlamydiale Inklusion von einer Art Käfigstruktur aus Mikrotubuli umhüllt, welche angereichert an posttranslational modifiziertem, insbesondere acetyliertem und detyrosiniertem, α -Tubulin ist (Al-Zeer et al. 2014). Die entstandenen Mikrotubuli-Käfige dienen zum einen der strukturellen Stabilisierung der parasitophoren Vakuole, zum anderen werden sie genutzt, um Golgi-*Ministacks* um die PV zu positionieren und die Entwicklung derselben zu fördern (Al-Zeer et al. 2014, Al-Younes et al.

2011). Aufgrund der bedeutenden Rolle von Mikrotubuli und des Golgi-Apparates für die erfolgreiche Etablierung einer PV sowie die Nährstoffversorgung, wurde im Folgenden die Assoziation chlamydialer Inklusionen mit stabilen Mikrotubuli (acetyliertem α -Tubulin) sowie dem Golgi-Apparat in DCs und Epithelzellen 24 und 48 hpi in der Immunfluoreszenz vergleichend untersucht (Abb. 4-13).

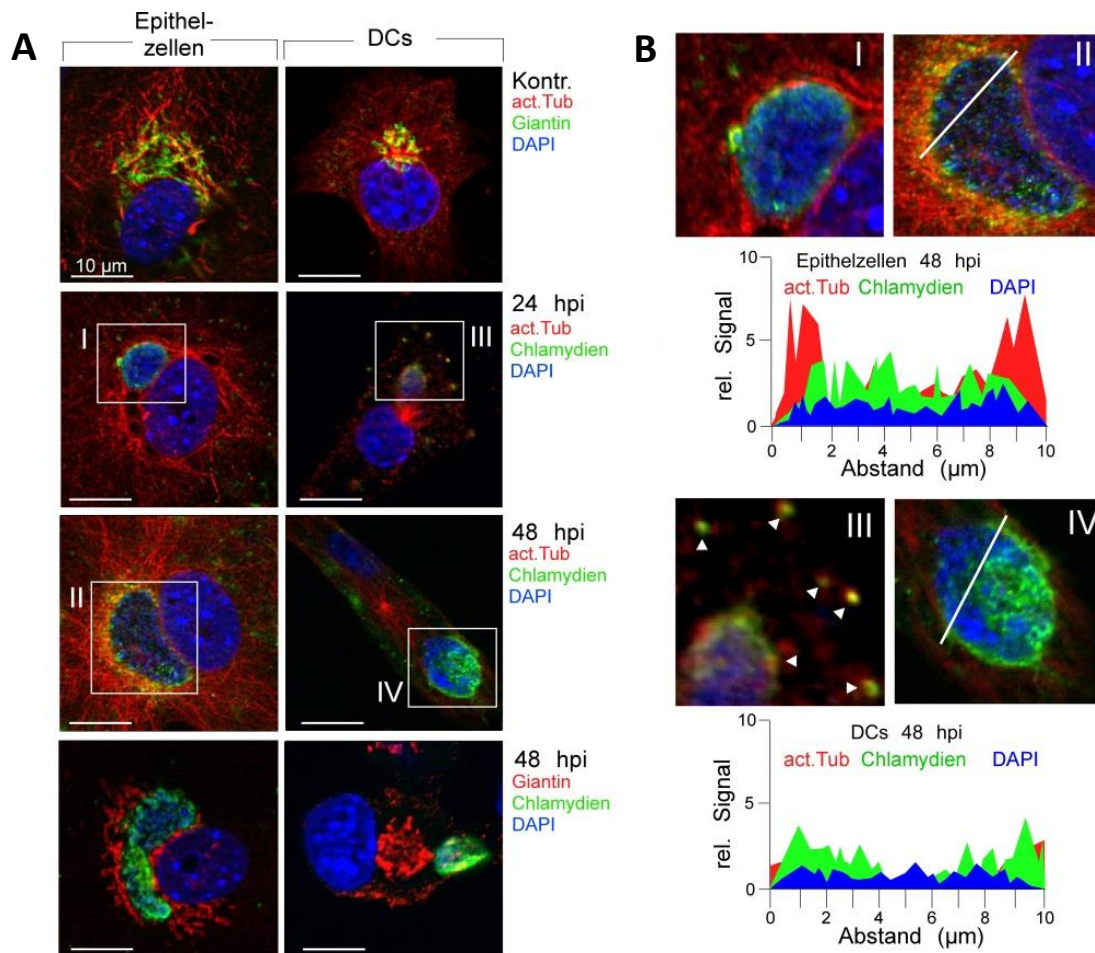


Abb. 4-13 Lokalisation von acetyliertem α -Tubulin während der Infektion

Immunfluoreszenz-Analyse zur Untersuchung der Mikrotubuli- und Golgi-Apparat-Interaktion von Chlamydien in DCs (JAWSII) und Epithelzellen (MN-R). (A) Nicht-infizierte und *C. psittaci*-infizierte (24 und 48 hpi) JAWSII- und MN-R-Zellen wurden für acetyliertes α -Tubulin (rot), Golgi-Apparat (Giantin, rot bzw. grün), Chlamydien (grün) und DNA (DAPI, blau) angefärbt. (B) Vergrößerte Bildausschnitte (I-IV aus Abb. A) zeigen chlamydiale Strukturen sowie die Verteilung von acetyliertem α -Tubulin in Epithelzellen (1. Abb. von oben) bzw. DCs (3. Abb. von oben). Chlamydiale Strukturen sind z.T. durch weiße Pfeile markiert. Die 2. bzw. 4. Abb. von oben zeigt die übereinandergelegten Profile der ermittelten Fluoreszenzintensitäten entlang des jeweils darüber vergrößert dargestellten zellulären Querschnitts (ImageJ).

Wie in Abb. 4-13 zu sehen, konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine peri-nukleäre Lokalisation der PV in Epithelzellen beobachtet werden. Des Weiteren war die PV von einer käfigartigen Struktur aus stabilen Mikrotubuli (acetyliertem α -Tubulin) umhüllt und zudem von Golgi-Stacks umgeben. In DCs hingegen nahmen die PVs keine peri-nukleäre Lokalisation ein und acetyliertes α -Tubulin war

lediglich in der Nähe des MTOCs nachzuweisen. Außerdem waren chlamydiale Strukturen nicht oder kaum mit dem Golgi-Apparat assoziiert, welcher sich hauptsächlich in der Nähe des MTOCs befand. Folglich scheint in DCs der Mikrotubuli-abhängige Transport der chlamydialen Inklusionen zum MTOC und damit die essentielle Interaktion mit dem Golgi-Apparat auszubleiben. Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, ob die fehlende Assoziation chlamydialer Strukturen mit acetyliertem α -Tubulin auf eine Deacetylierung desselben zurückzuführen ist. Histondeacetylase 6 (HDAC6) kann, neben einer Reihe anderer Funktionen, eine Rolle in der Deacetylierung von α -Tubulin assemblierter Mikrotubuli zugeschrieben werden (Hubbert et al. 2002). Um zu untersuchen, ob der für DCs beobachtete Phänotyp mit einer Deacetylierung von α -Tubulin begründet werden kann und ob HDAC6 den dafür verantwortlichen Faktor darstellt, wurde zunächst in Western-Blot-Analysen die Expression von acetyliertem α -Tubulin sowie HDAC6 in DCs und Epithelzellen, über einen Infektionszeitraum von 48 h hin, verfolgt (Abb. 4-14).

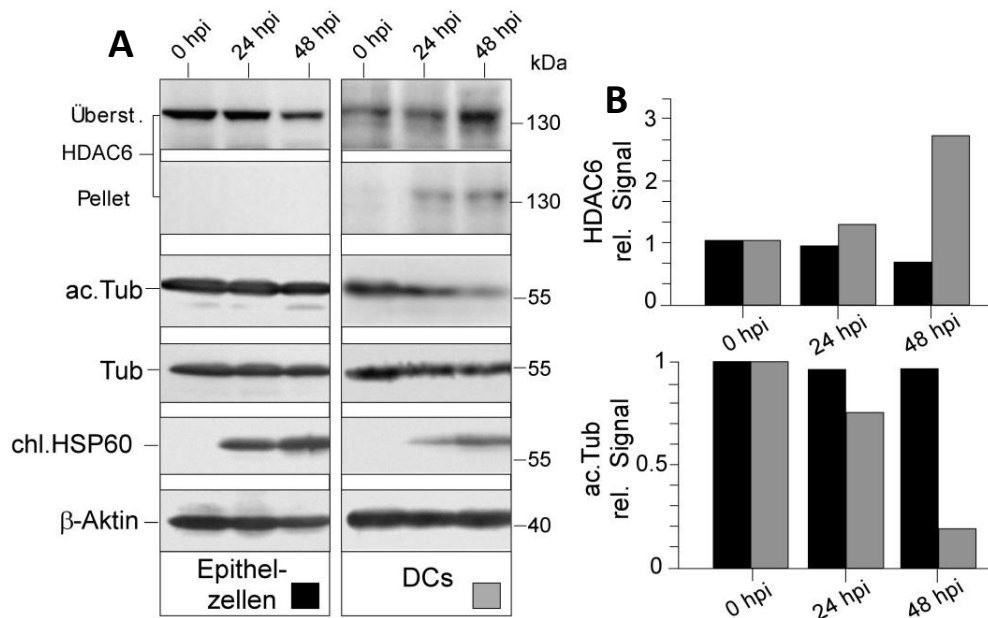


Abb. 4-14 Expression von acetyliertem α -Tubulin und HDAC6

(A) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung von HDAC6 (Überstand- und Pellet-Fraktion), acetyliertem α -Tubulin (ac. Tub.), Gesamt-Tubulin (Tub) und chlamydialem HSP60 (chl.HSP60) in *C. psittaci*-infizierten und nicht-infizierten Epithelzellen (MN-R) und DCs (JAWSII). (B) Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von HDAC6 (Überstand-Fraktion) (oben) und acetyliertem α -Tubulin (unten) quantifiziert und anschließend auf β -Aktin normiert. Die Bandenintensität für nicht infizierte Zellen wurde jeweils auf 1 gesetzt.

Abb. 4-14 zeigt eine Abnahme von acetyliertem α -Tubulin im Infektionsverlauf von DCs (Faktor 5), bei gleichbleibender Expression von Gesamt-Tubulin. In Epithelzellen hingegen blieb das Signal für acetyliertes α -Tubulin über den gesamten Infektionsverlauf nahezu konstant. Einhergehend mit der Abnahme von acetyliertem α -Tubulin, kam es in DCs während des Infektionsverlaufs zu einer Hochregulation der HDAC6-Expression (Faktor 3); in Epithelzellen hingegen konnte sogar eine leichte Reduktion des HDAC6-Signals beobachtet werden. Demnach wäre eine Deacetylierung von acetyliertem α -Tubulin durch HDAC6 in infizierten DCs möglich. Auffällig war zudem, dass HDAC6 in infizierten DCs, im Gegensatz zu Epithelzellen, nicht nur in der löslichen Lysatfraktion (Überstand), sondern ebenfalls in der unlöslichen Pellet-Fraktion vorkam. Diese Beobachtung lieferte einen ersten Hinweis für die Beteiligung von HDAC6 an einer Aggresomen-vermittelten Degradation chlamydialer Strukturen (Kawaguchi et al. 2003, Iwata et al. 2005), worauf in Kapitel 4.1.6 noch detaillierter eingegangen wird. Um die mögliche Rolle von HDAC6 in der Deacetylierung von α -Tubulin während der Chlamydieninfektion von DCs endgültig zu klären, schlossen sich Inhibitionsexperimente mit dem pharmakologischen HDAC6-Inhibitor Tubacin an. Dafür wurden DCs mit Chlamydien infiziert und 6 h später mit Tubacin behandelt. 24 und 48 h nach der Infektion wurde dann die Expression von acetyliertem α -Tubulin im Western-Blot (Abb. 4-15 A) sowie die Lokalisation von acetyliertem α -Tubulin in der Zelle mittels Immunfluoreszenz (Abb. 4-15 B) analysiert.

Ergebnisse

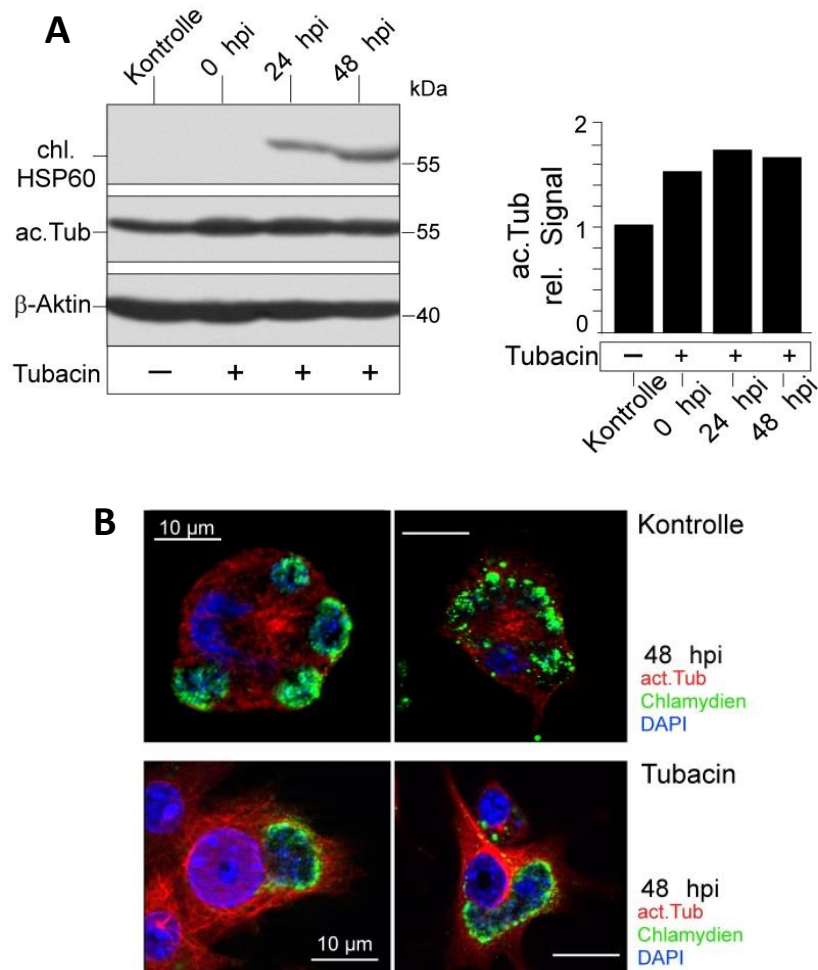


Abb. 4-15 Inhibition von HDAC6 führt zu einem Epithelzell-ähnlichen Phänotyp

(A) Untersuchung von chlamydialem HSP60 (chl. HSP60) und acetyliertem α -Tubulin (ac. Tub) in *C. psittaci*- (MOI 10) infizierten und HDAC6-inhibierten JAWSII-Zellen mittels Western-Blot. 6 h nach der Infektion wurden die Zellen mit Tubacin (2,8 μ M) behandelt (links). Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von acetyliertem α -Tubulin quantifiziert und anschließend auf β -Aktin normiert. Die Bandenintensität für nicht infizierte, unbehandelte Zellen wurde auf 1 gesetzt (rechts). (B) Immunfluoreszenz-Analyse infizierter, mit Tubacin-behandelter und unbehandelter JAWSII-Zellen, 48 hpi. Die Zellen wurden für acetyliertes α -Tubulin (rot), Chlamydien (grün) und DNA (DAPI, blau) angefärbt.

Wie in Abb. 4-15 A zu sehen, führte die Inhibition von HDAC6 mittels Tubacin zu einer relativ konstanten Expression von acetyliertem α -Tubulin über den Infektionsverlauf von 48 h. Durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass die chlamydialen Inklusionen in Tubacin-behandelten Zellen eine Kern-nahe Lokalisation erhielten und zudem mit acetyliertem α -Tubulin umhüllt waren (Abb. 4-15 B). Des Weiteren fiel auf, dass die Tubacin-Behandlung zur Ausbildung einzelner, deutlich größerer (10-30 μ m) Inklusionen führte, wohingegen Kontrollzellen sich durch das Vorhandensein multipler, kleiner ($\leq 5 \mu$ m) chlamydialer Strukturen auszeichneten. Demnach ist HDAC6 tatsächlich für den Verlust acetylierter Mikrotubuli in

DCs verantwortlich, die folglich nicht mehr für die strukturelle Stabilisierung, Entwicklung sowie den peri-nukleären Transport der chlamydialen Inklusionen zur Verfügung stehen. Dies ermöglicht es infizierten DCs, die durch cPLA2-Einwirkung destabilisierten Inklusionen von der vesikulären Versorgung abzukoppeln und durch weitere intrazelluläre Abwehrmechanismen anzugreifen.

4.1.6 Aggresomen-vermittelter Abbau von chlamydialen Strukturen

Ein plausibler Mechanismus, über den die destabilisierten Inklusionen intrazellulär abgebaut werden könnten, wäre die Aggresomen-vermittelte Autophagie, auch Aggrephagie genannt. Das Ubiquitin-bindende Chaperon HSP25/27 (Hspb1) ist eine zentrale Komponente der Aggrephagie, da es funktional mit verschiedenen aggresomalen Komponenten, wie u.a. Aktin, Tubulin, Vimentin, Parkin sowie HDAC6 interagiert (Ito et al. 2002, Bolhuis and Richter-Landsberg 2010). Des Weiteren beeinflusst HSP25/27 die Verteilung und Löslichkeit von Vimentin (Liu et al. 2010), dem Hauptbestandteil von Aggresomen. Neben HSP25/27 stellt HDAC6 eine weitere Schlüsselkomponente der Aggrephagie dar, da es sowohl an der Aggresomenbildung, als auch am Transport der Aggresomen entlang von Mikrotubuli zum MTOC beteiligt ist (Kawaguchi et al. 2003, Iwata et al. 2005, Yao 2010). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits eine Infektions-abhängige Hochregulation der HSP25/27-Expression sowie die HSP25/27-vermittelte Rekrutierung von Vimentin an die chlamydiale Inklusion nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde die Akkumulation von HSP25/27 in der unlöslichen Zellfraktion gezeigt (Danny Kägebein, Dissertation). Zusammen mit der hiesigen Beobachtung, dass HDAC6 in infizierten DCs ebenfalls in der unlöslichen Pelletfraktion akkumulierte (Abb. 4-14), kam die Vermutung auf, dass die chlamydialen Strukturen in DCs mittels Aggrephagie abgebaut werden könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, schlossen sich zunächst Experimente zur Untersuchung der Vimentinexpression sowie einer möglichen Aggregation von Vimentin während der Infektion von DCs an. Dafür wurden zum einen Immuno-*Dotblot*-Analysen für die Bestimmung des Gesamtvimentingehalts von DCs während der Infektion (Abb. 4-16 A) durchgeführt. Zum anderen dienten Western-Blot-Analysen der Quantifizierung von Vimentin in der löslichen und unlöslichen Lysatfraktion (Abb. 4-16 B).

Ergebnisse

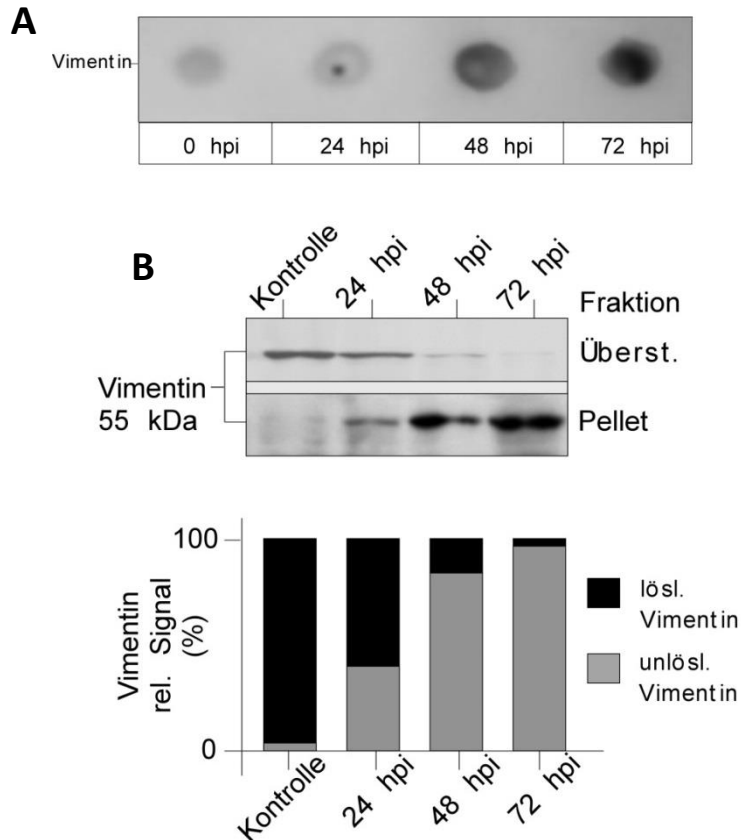


Abb. 4-16 Erhöhte Vimentinexpression und -aggregation während der Infektion

(A) Immuno-Dotblot-Analyse zur Untersuchung der Gesamtvimentinmenge in DCs. *C. psittaci*-infizierte JAWSII-Zellen wurden unmittelbar nach dem abtrypsinieren in 8 M Harnstoff-2x SDS-Ladepuffer extrahiert und im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Anschließend erfolgte die Anfärbung mit einem anti-Vimentin Antikörper. (B) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung von Vimentin (Überstand- und Pellet-Fraktion) in *C. psittaci*-infizierten DCs (oben). Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten beider Vimentinfraktionen quantifiziert und daraus der relative Anteil von löslichem und unlöslichem Vimentin (%) bestimmt (unten).

Die Vimentininduktion ist ein charakteristisches Merkmal der funktionalen DC-Reifung (Le Naour et al. 2001). Wie in Abb. 4-16 A ersichtlich, kam es auch während der Chlamydieninfektion zu einem massiven Anstieg des Gesamtvimentinanteils in DCs. Zudem konnte mithilfe von Western-Blot-Analysen, durch die separate Analyse der löslichen und unlöslichen Zelllysatzfraktion, eine Abnahme von Vimentin im Überstand beobachtet werden, die von einer deutlichen Zunahme des Proteins in der Pelletfraktion begleitet war (Abb. 4-16 B). Folglich scheint es während der Chlamydieninfektion von DCs zu einer Aggregatbildung von Vimentin zu kommen, was wiederum auf eine Aggresomen-vermittelte Autophagie hindeutet. Durch zusätzliche Immunfluoreszenz- (Abb. 4-17 A) sowie durchflusszytometrische Analysen (Abb. 4-17 B) wurde im Folgenden die Bildung von Aggresomen sowie deren Assoziation mit Chlamydien in DCs untersucht. Dafür kam das *Proteostat® Aggresome*

Detection Kit (s. Kapitel 3.3.7) zum Einsatz, das einen rot fluoreszierenden Rotorfarbstoff enthält, welcher spezifisch nur aggregierte Strukturen in der Zelle anfärbt. Des Weiteren wurde mittels TEM-Analysen das Vorhandensein von aggregiertem Material in infizierten DCs analysiert (Abb. 4-17 C).

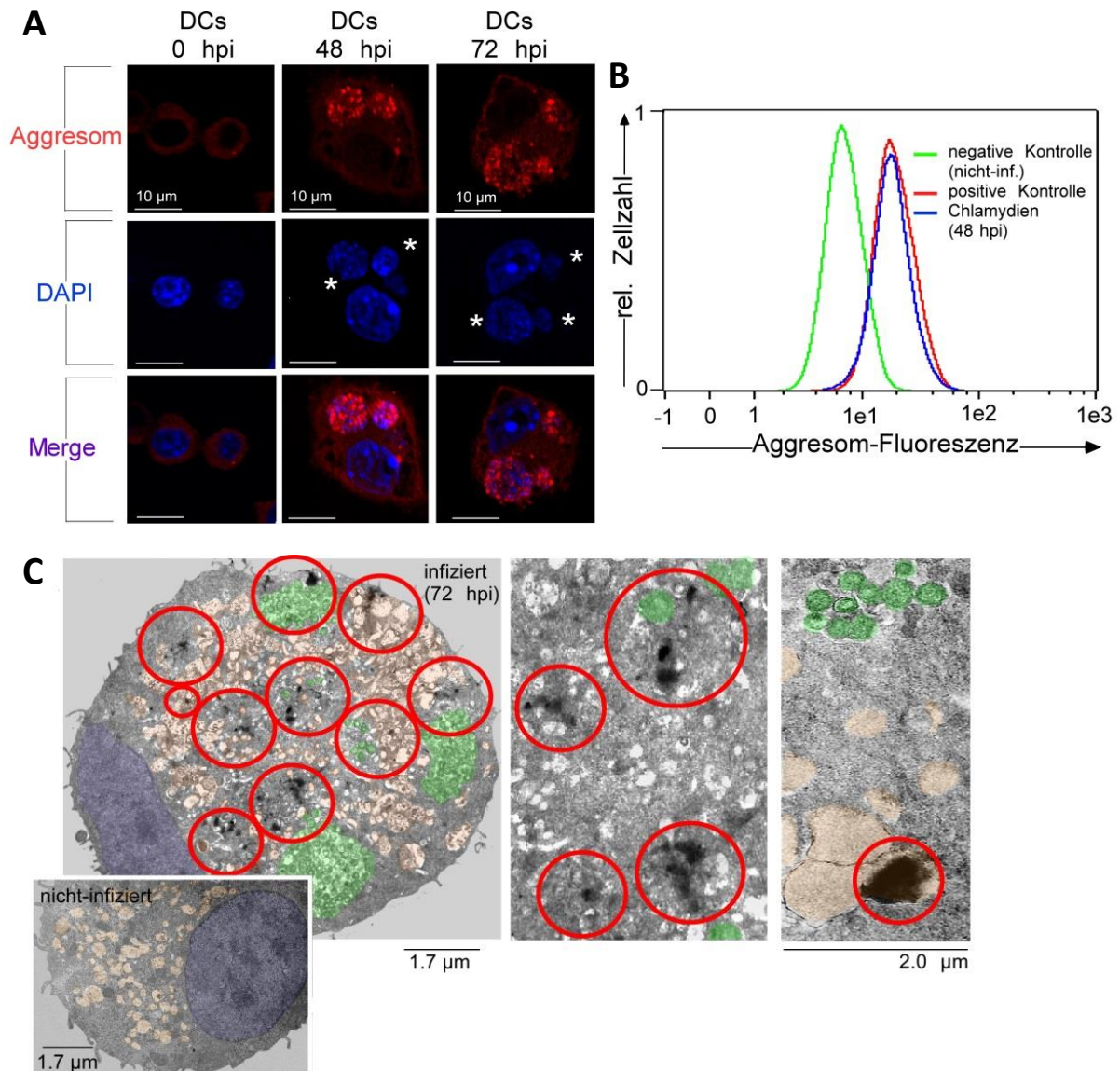


Abb. 4-17 Aggresomenbildung in infizierten DCs

(A) Immunfluoreszenz-Analyse zur Untersuchung der Aggresomenbildung in DCs. *C. psittaci*-infizierte JAWSII-Zellen wurden für Aggresomen (*Aggresome Detection Kit*, rot) und DNA (DAPI, blau) angefärbt. Chlamydiale Strukturen wurden durch weiße Sterne markiert. (B) Durchflusszytometrische Analyse der Aggresomenbildung in DCs unter Verwendung des *Aggresome Detection Kits*. JAWSII-Zellen wurden für 48 h mit *C. psittaci* infiziert (MOI 10) oder blieben nicht infiziert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 18 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 inkubiert. Die erhaltenen Fluoreszenzprofile infizierter und nicht-infizierter DCs sind übereinander gelagert in einem Histogramm dargestellt. (C) TEM-Analyse *C. psittaci*-infizierter (72 hpi) (oben) und nicht-infizierter (unten) JAWSII-Zellen. Die mittlere Aufnahme zeigt die vergrößerte Darstellung eines ausgewählten Bildausschnitts der linken Aufnahme. Aggregiertes elektronendichtes Material (rote Kreise) befand sich in der Nähe von chlamydialen Inklusionen sowie bereits zytosolisch gewordenen chlamydialen Strukturen (artifizell in grün angefärbt). Einige infizierte DCs zeigten elektronendichtes Material innerhalb intakter Vakuolen (rechte Aufnahme). Der Zellkern wurde nachträglich blau und vakuolare Strukturen braun eingefärbt.

Wie in Abb. 4-17 A deutlich zu erkennen, kam es im Infektionsverlauf von DCs zu einer massiven Akkumulation aggresomaler Strukturen. Des Weiteren konnte eine starke Assoziation chlamydialer Inklusionen (weiße Sterne) mit Aggresomen gezeigt werden. Auch mithilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen (Abb. 4-17 B) konnte eine Akkumulation von Aggregaten in infizierten Zellen beobachtet werden. Die durch die Infektion induzierte Anreicherung von Aggregaten war dabei genauso stark, wie durch die Behandlung mit MG-132, einem Proteasominhibitor, der zur aggresomalen Induktion in Zellen eingesetzt wird (Fratta et al. 2005). Sogar in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4-17 C) konnten Aggregate als elektronendichtes Material (rote Kreise) in infizierten DCs identifiziert werden. Diese waren dabei in enger Assoziation mit intakten oder desintegrierten chlamydialen Inklusionen sowie bereits zytosolisch gewordenen Bakterien zu finden. In nicht-infizierten Kontrollzellen hingegen konnten keine Aggregate beobachtet werden. Um die aggregierten Strukturen zunächst vorläufig hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu charakterisieren, schlossen sich weitere Immunfluoreszenz-Analysen von infizierten DCs (48 hpi) an. Der Fokus lag dabei auf der Assoziation aggregierter Strukturen mit zentralen Komponenten der Aggrephagiemaschinerie (Vimentin, HDAC6) sowie defekten Mitochondrien (Pink-1) (Abb. 4-18).

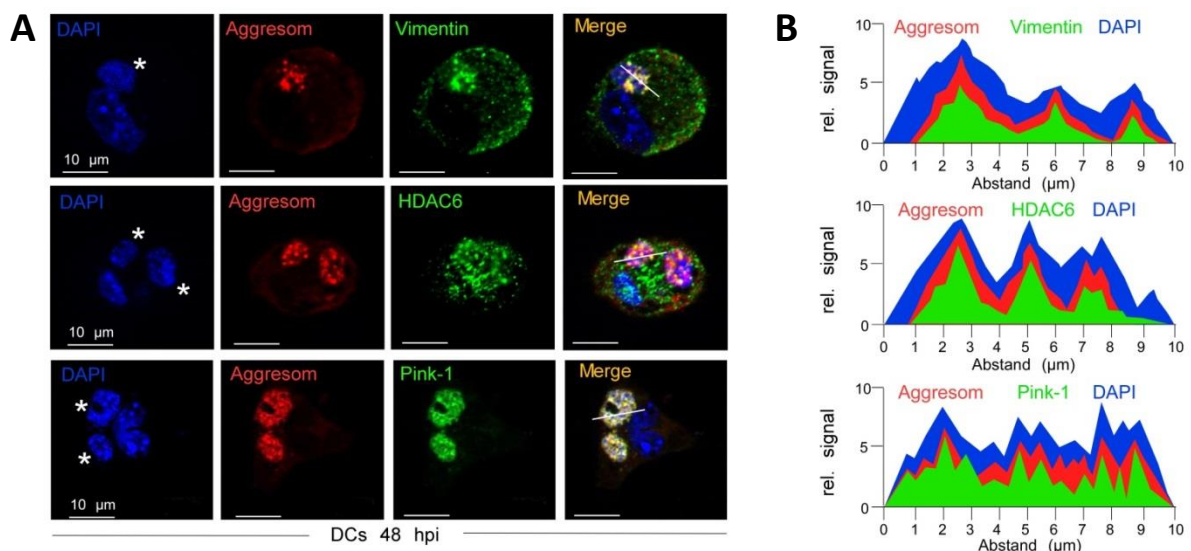


Abb. 4-18 Assoziation von Aggregaten mit Aggrephagie-/Mitophagieproteinen

(A) *C. psittaci*-infizierte JAWII-Zellen (48 hpi) wurden für Vimentin, HDAC6 oder Pink-1 (grün), Aggresomen (Aggresome Detection Kit, rot) und DNA (DAPI, blau) angefärbt. Chlamydiale Strukturen wurden durch weiße Sterne markiert. (B) Die Fluoreszenzintensitäten entlang des jeweils in (A) markierten zellulären Querschnitts wurden gemessen und die Profile anschließend übereinandergelegt (ImageJ).

Wie in Abb. 4-18 deutlich zu erkennen, co-lokalisieren sowohl chlamydiale, als auch aggregierte Strukturen mit Vimentin, dem Hauptbestandteil von Aggresomen, sowie mit HDAC6, einer der

Schlüsselkomponenten der Aggresomenbildung und des aggresomalen Transports (Kawaguchi et al. 2003, Yao 2010, Iwata et al. 2005). Des Weiteren konnte eine Assoziation von Chlamydien und aggregierten Strukturen mit Pink-1, einem Markerprotein für defekte Mitochondrien (Narendra et al. 2010), beobachtet werden. Im Rahmen der Mitophagie erfolgt, nach dem Funktionsverlust und der Destruktion der Mitochondrien, ebenfalls deren HDAC6-vermittelter Transport zum MTOC und die Aggregation zu „Mito-Aggresomen“ (Vives-Bauza et al. 2010, Lee, Nagano, et al. 2010, Okatsu et al. 2010). Dass Pink-1 und somit defekte Mitochondrien sowohl mit Aggresomen, als auch mit chlamydialen Strukturen co-lokalisierten, lieferte somit einen ersten Hinweis für eine synchrone Degradation der Chlamydien und Mitochondrien mittels Mitophagie. Um die aggregierenden Strukturen in infizierten DCs hinsichtlich charakteristischer aggresomaler Markerproteine, wie HSPs, Zytoskelettelementen sowie mitochondrialen und chlamydialen Proteinen zu charakterisieren, schlossen sich massenspektrometrische Untersuchungen an. Dafür wurden Aggresomen mithilfe eines Sucrose-Gradienten und mehrfacher Zentrifugationsschritte (s. Kapitel 3.4.5) aus infizierten (48 hpi) und nicht-infizierten DCs isoliert und im Folgenden für Gelelektrophorese/Silberfärbung (Abb. 4-19 A), Western-Blot- (Abb. 4-19 B) und massenspektrometrische Analysen (Abb. 4-19 C) eingesetzt.

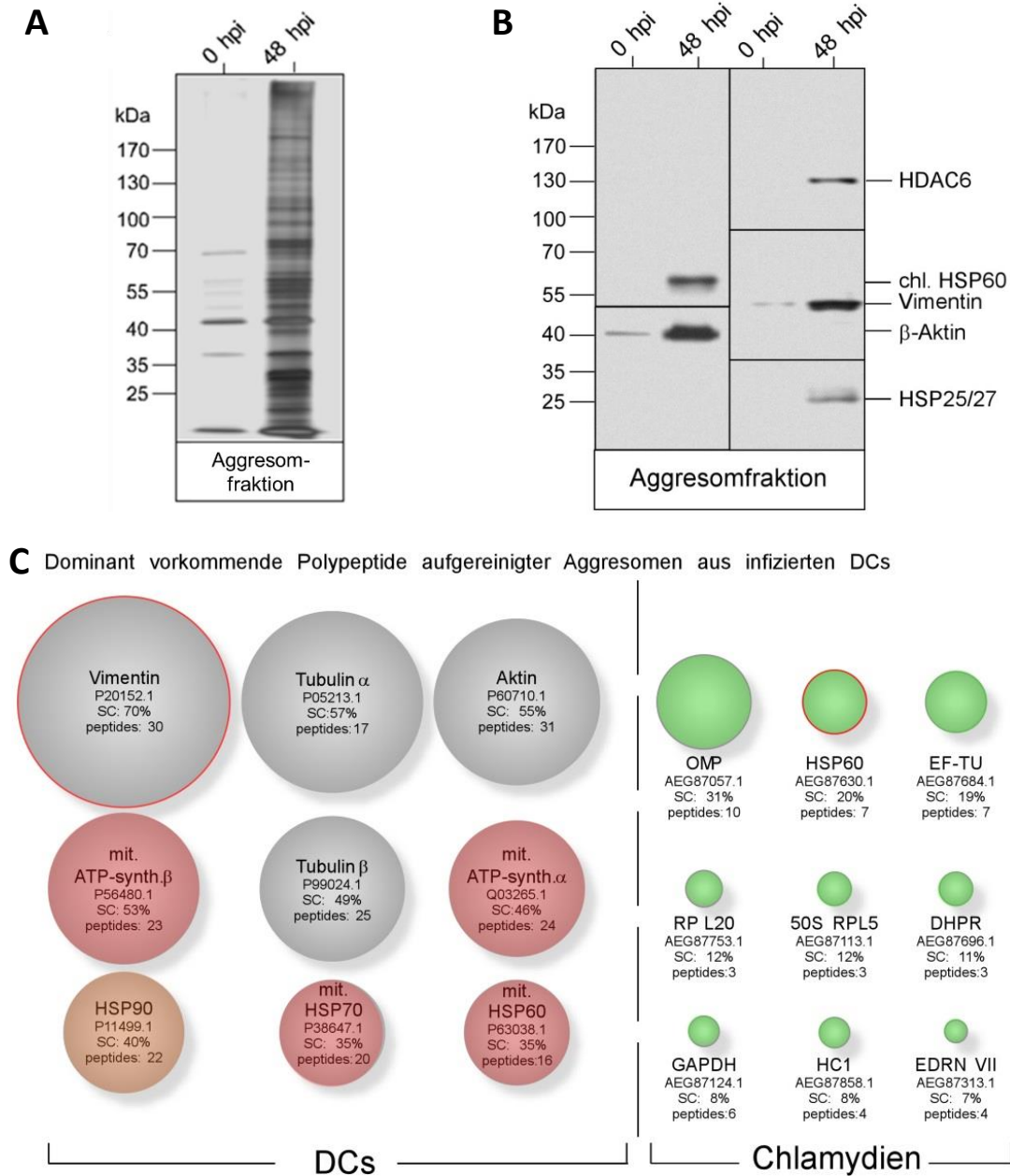


Abb. 4-19 Identifizierung aggresomaler Proteine

(A) Aufgereinigte Fraktion aggresomaler Proteine aus *C. psittaci*-infizierten (MOI 10, 48 hpi) und nicht infizierten JAWSII-Zellen nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Silberfärbung. (B) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Vorkommens von chlamydialem HSP60 (chl. HSP60), HDAC6, Vimentin, β-Aktin und HSP25/27 in isolierten Aggresomen aus *C. psittaci*-infizierten (MOI 10, 48 hpi) und nicht infizierten JAWSII-Zellen. (C) nLC MALDI-TOF/TOF MS-Analyse isolierter Aggresomen. Dargestellt sind die am häufigsten vorkommenden zellulären (links) und bakteriellen (rechts) Proteine isolierter Aggresomen. Jedes der identifizierten Proteine ist als Kreis einer definierten Fläche dargestellt, die direkt mit der entsprechenden Sequenzabdeckung (in %) übereinstimmt. Zytoskelett-Proteine sind grau, mitochondriale Proteine rot, HSPs orange und chlamydiale Proteine grün markiert. Chlamydiales HSP60 (chl. HSP60) und Vimentin dienen als Wirt- bzw. bakterielles Referenzprotein (identifiziert im Western-Blot) und sind durch einen roten Rahmen gekennzeichnet.

Die gelelektrophoretische Analyse zeigt eine sehr deutliche Zunahme von aggresomalen Proteinen nach der chlamydialen Infektion und entsprechenden Reifung der DCs (Abb. 4-19 A). Durch die Western-Blot-Analyse konnte die Akkumulation der aggresomalen Proteine Vimentin und HDAC6 noch einmal belegt werden (Abb. 4-19 B). Zudem konnte HSP25/27, β -Aktin sowie chlamydiales HSP60 (chl. HSP60) in isolierten Aggresomen aus infizierten DCs nachgewiesen werden. In der Aggresomen-Fraktion nicht-infizierter DCs hingegen, kamen diese Proteine in einem deutlich geringeren Ausmaß (Vimentin, β -Aktin) vor, einige konnten gar nicht nachgewiesen werden (HDAC6, HSP25/27). Durch massenspektrometrische Untersuchungen von Aggresomen infizierter DCs konnte das Vorhandensein verschiedener Wirtszell- sowie chlamydialer Proteine noch einmal bestätigt und die Zusammensetzung von Aggresomen detaillierter analysiert werden. In Abb. 4-19 C sind die dominant vorkommenden Polypeptide aufgereinigter Aggresomen anhand eines Schemas dargestellt. Als vorwiegend vertretende Wirtszell-Polypeptide (links) wurden neben dem Hauptbestandteil von Aggresomen Vimentin, weitere bekannte aggresomale Proteine wie Aktin, α -/ β -Tubulin (grau) und HSP90 (orange) identifiziert. Des Weiteren konnten verschiedene Proteine mitochondrialen Ursprungs (rot) identifiziert werden, wie beispielsweise ATP-Synthase (α -/ β -Untereinheit) sowie mitochondriales HSP60 und HSP70. Außerdem wurden eine Reihe chlamydialer Proteine (rechts, grün) in isolierten Aggresomen identifiziert, darunter ganz oben in der Häufigkeit das *outer membrane protein* (OMP) und HSP60 sowie weitere Chaperone, Membran-gebundene Proteine, Enzyme und ribosomale Proteine.

Bereits die Co-Lokalisation defekter Mitochondrien (Pink-1), Aggresomen und chlamydialen Strukturen, lieferte einen ersten Hinweis für eine gemeinsame Degradation von Chlamydien und Mitochondrien mittels Mitophagie (Abb. 4-18). Diese Hypothese wurde weiterhin durch die massenspektrometrischen Untersuchungen untermauert, durch die in isolierten Aggresomen sowohl chlamydiale als auch mitochondriale Proteine identifiziert werden konnten. Hauptkomponenten der Mitophagie-Maschinerie sind neben Ubiquitin und dem Adapterprotein p62 insbesondere die E3-Ubiquitinligase Parkin (Lee, Nagano, et al. 2010). Um zu untersuchen, ob die mit Mitochondrien assoziierten chlamydialen Strukturen tatsächlich dem mitophagosomalen Abbau zugeführt werden, wurde nachfolgend die Co-Lokalisation von Chlamydien mit den oben bereits genannten Proteinen der Mitophagie-Maschinerie mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 4-20).

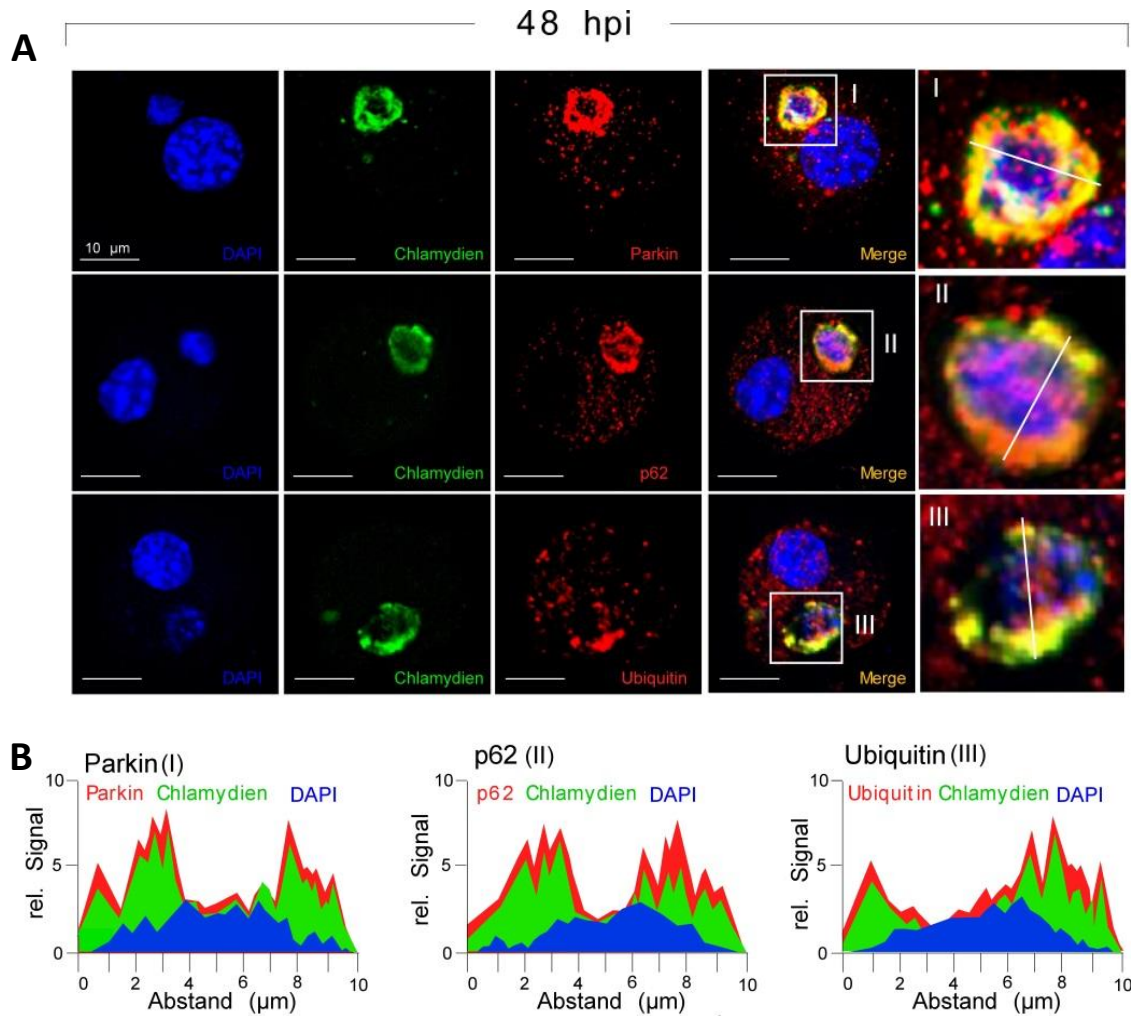


Abb. 4-20 Assoziation von Chlamydien mit Mitophagie-assoziierten Proteinen

(A) Immunfluoreszenz-Analyse der Co-Lokalisation chlamydialer Strukturen (grün) und Parkin, p62 oder Ubiquitin (rot) sowie DNA (DAPI, blau) in *C. psittaci*-infizierten JAWSII-Zellen (MOI 10, 48 hpi). Vergrößerte Bildausschnitte (I-III, rechts) zeigen die Co-Lokalisation Mitophagie-assoziiierter Proteine und chlamydialer Strukturen. (B) Die Fluoreszenzintensitäten entlang des jeweils markierten zellulären Querschnitts wurden gemessen und die Profile anschließend übereinandergelegt (ImageJ).

Wie in Abb. 4-20 deutlich zu erkennen, kam es 48 hpi in DCs zu einer starken Co-Lokalisation chlamydialer Strukturen mit den drei untersuchten Komponenten des Mitophagieweges Parkin, p62 und Ubiquitin. Zusammen deuten die Daten stark darauf hin, dass die chlamydialen Inklusionen nach erfolgter Desintegration zusammen mit defekten Mitochondrien in Aggresomen aggregieren, die vermittelt durch Parkin ubiquitiniert und letztendlich durch das Adapterprotein p62, LC-3-positiven Membranen zugeführt werden.

4.1.7 Beteiligung der aggresomalen Proteine Parkin, HSP25/27 und HDAC6 am autophagosomalen Abbau von Chlamydien

Das vermutete Szenario eines gemeinsamen Abbaus defekter Mitochondrien und desintegrierter Inklusionen mittels Aggresomen-vermittelter Mitophagie wurde abschließend durch siRNA-vermittelte *Knockdown*-Experimente bestätigt. Untersucht wurde der Einfluss des *Knockdowns* von Parkin, als Schlüsselkomponente der Mitophagie, HSP25/27 als Aggregatbildung-induzierendes Chaperon sowie HDAC6 als wichtiges Protein des Aggresomentransports, auf die Autophagieinduktion (Abb. 4-21), LC3-Rekrutierung (Abb. 4-22), Infektion sowie die funktionale Antigenpräsentation (Abb. 4-23).

Ergebnisse

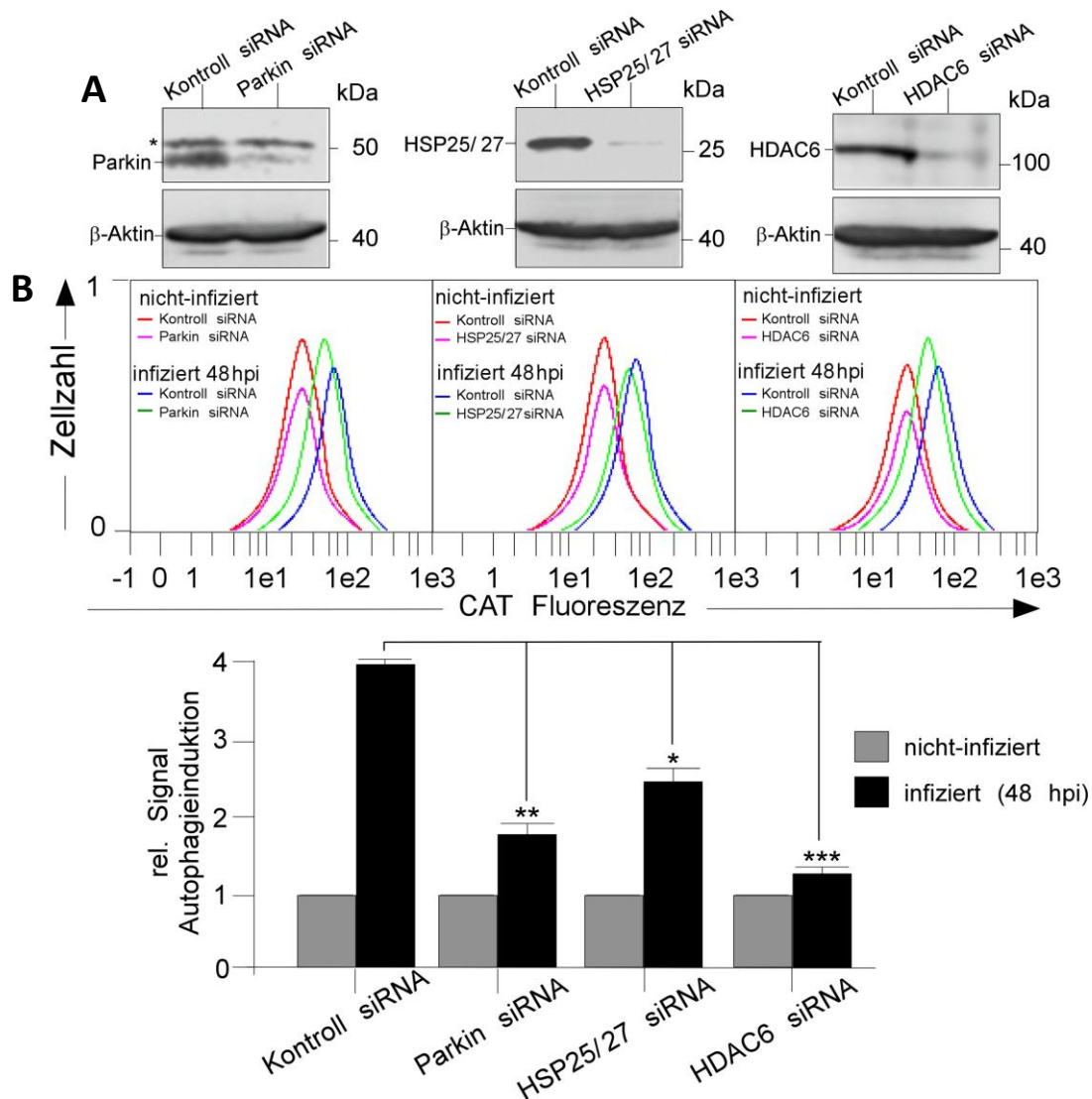


Abb. 4-21 Einfluss der *Knockdowns* Aggrephagie-assoziiierter Proteine auf die Autophagie

(A) Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der *Knockdown*-Effizienz der Parkin-, HSP25/27- und HDAC6-siRNA in nicht-infizierten JAWSII-Zellen. Der Stern kennzeichnet eine unspezifische kreuzreaktive Bande. (B) Durchflusszytometrische Untersuchung der Autophagie unter Verwendung des *Cyto-ID*-Kits. JAWSII-Zellen wurden mit der entsprechenden siRNA transfiziert und 6 h später für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert oder nicht weiter behandelt. Als Kontrolle wurden infizierte und nicht infizierte Zellen mitgeführt, die zuvor gleichermaßen mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert wurden (oben). Mittelwerte der MFI aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die MFI für nicht infizierte Kontroll-siRNA transfizierte JAWSII-Zellen wurde auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n = 3$) (unten).

Wie anhand der Western-Blot-Analysen im oberen Teil der Abb. 4-21 A zu sehen, erwiesen sich die siRNA-basierten *Knockdowns* aller drei Proteine über einen Zeitraum von 48 h als stabil und sehr effizient. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Autophagie mittels *Cyto-ID*-Kit (s. Kapitel 3.3.6) konnte weiterhin zeigen, dass es durch die *Knockdowns* der verschiedenen Proteine des Aggrephagie-/Mitophagieweges, im Vergleich zum *Knockdown* mit Kontroll-siRNA, zu einer

deutlichen Reduktion der Autophagieinduktion kam (Abb. 4-21 A, unten, Abb. 4-21 B). Während die Autophagie in Kontroll-KD-Zellen um den Faktor 4 anstieg, war für Parkin- und HDAC6-KD-Zellen nur eine Induktion um den Faktor 1,8 bzw. 1,2 zu verzeichnen. Der *Knockdown* von HSP25/27 hatte, mit einer Induktion der Autophagie um den Faktor 2,5, den geringsten Einfluss. Dass diese Proteine für eine effiziente Infektions-induzierte Autophagie erforderlich sind, konnte auch anhand von Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt werden. Wie in Abb. 4-22 (I-IV) zu erkennen, konnte in *Knockdown*-Zellen nur eine sehr schwache bis keine Co-Lokalisation chlamydialer Inklusionen mit dem Autophagiemarker LC3 beobachtet werden. In Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen hingegen, waren die chlamydialen Strukturen massiv mit LC3 assoziiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Parkin, als auch HSP25/27 und HDAC6 für eine erfolgreiche Rekrutierung von LC3 an die chlamydialen Inklusionen erforderlich ist. Auffällig war zudem die dramatische Vergrößerung der parasitophoren Vakuolen, die durch jeden der drei siRNA-*Knockdowns* zustande kam. Im Gegensatz zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen, in denen die PVs als multiple, stark fragmentierte Strukturen vorlagen, konnten in KD-Zellen lediglich einzelne intakte Inklusionen beobachtet werden, die fast die gesamte Zelle einnahmen (Abb. 4-22, V-VIII).

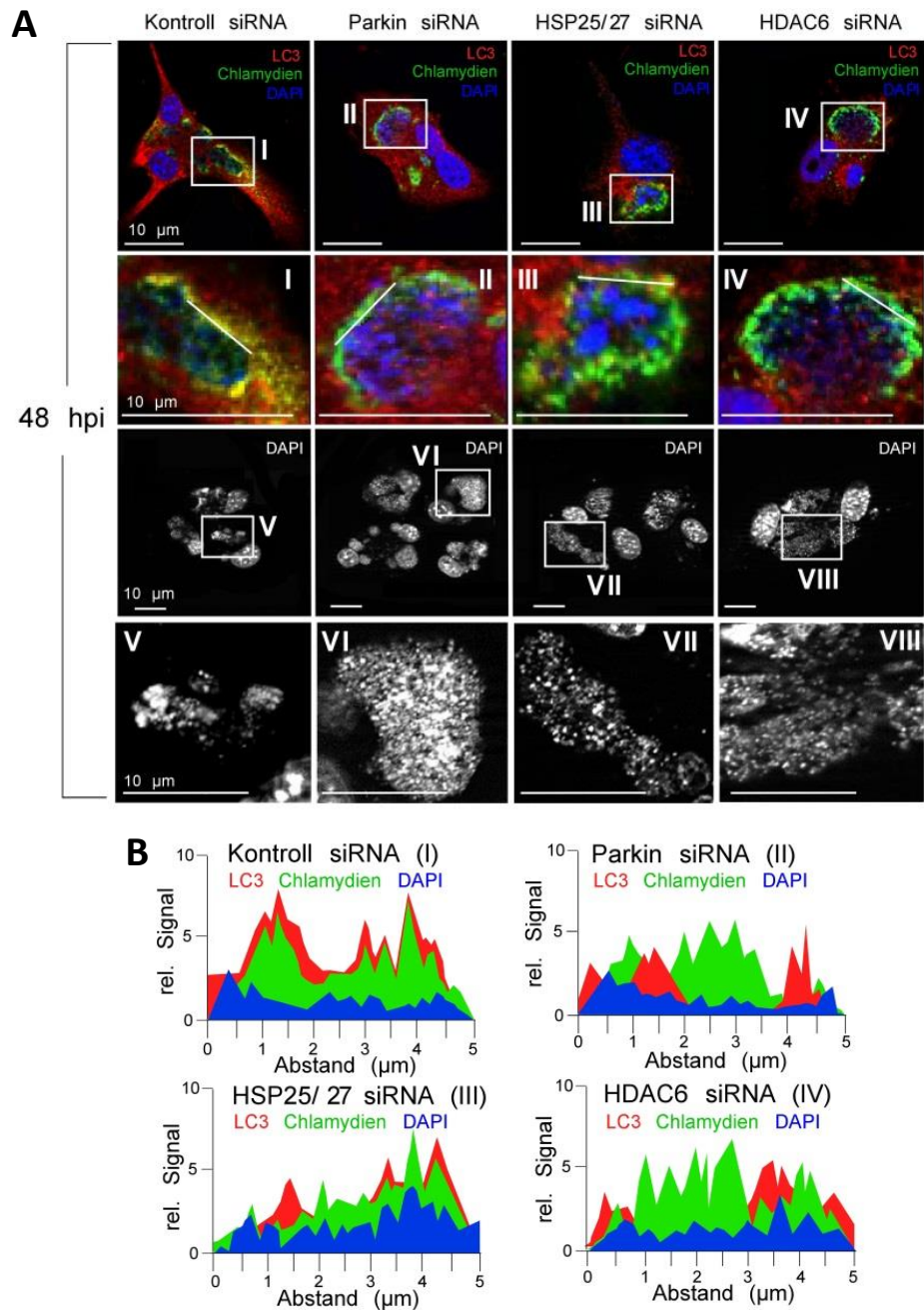


Abb. 4-22 LC-3-Assoziation von Chlamydien in KD-Zellen

(A) JAWSII-Zellen wurden mit Parkin-, HSP25/27- oder HDAC6-siRNA transfiziert und 6 h später für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert. Als Kontrolle wurden infizierte Zellen mitgeführt, die zuvor gleichermaßen mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Die transfizierten Zellen wurden für LC3 (rot), Chlamydien (grün) und DNA (DAPI, blau) angefärbt. Vergrößerte Bildausschnitte (I-IV) in der 2. Reihe von oben, zeigen die Co-Lokalisation von LC3 mit chlamydialen Strukturen. Reihe 3 zeigt den Einfluss der *Knockdowns* auf die physische Beschaffenheit der Inklusionen mittels DAPI-Anfärbung. Vergrößerte Bildausschnitte (V-VIII) in der untersten Reihe, zeigen die Größe und strukturelle Beschaffenheit der Inklusionen. (B) Die Fluoreszenzintensitäten entlang des jeweils markierten zellulären Querschnitts (I-IV) wurden gemessen und die Profile anschließend übereinandergelegt (ImageJ).

Einhergehend mit der veränderten Morphologie der chlamydialen Inklusionen infolge der *Knockdowns*, war in der Durchflusszytometrie 48 hpi ein deutlicher Anstieg in der Anzahl infizierter Zellen (Abb. 4-23 A und B, links) zu beobachten. Noch deutlicher wurde der Einfluss der *Knockdowns* auf die Infektion durch die Analyse des Anteils an Chlamydien pro Zelle (MFI). Den größten Effekt hatte auch hier wieder der *Knockdown* von HDAC6- die MFI war hier im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 2,9 erhöht, für den Parkin- und HSP25-/27-*Knockdown* stieg der Anteil an Chlamydien pro Zelle um das 2,2- bzw. 1,9-fache (Abb. 4-23 B, rechts). Die Untersuchung der IFN- γ -Sekretion Chlamydien-spezifischer CD8⁺ T-Zellen hat weiterhin gezeigt, dass die *Knockdowns* sich massiv auf die Fähigkeit infizierter DCs zur Antigenpräsentation auswirken. Im Vergleich zu Kontroll-siRNA-behandelten Zellen führten Parkin- und HSP25/27-KD-Zellen zu einer ca. 2-fach, HDAC6-KD-Zellen sogar zu einer fast 4-fach reduzierten T-Zellstimulation (Abb. 4-23 C). Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass sowohl Parkin, als auch HSP25/27 und HDAC6 entscheidend am autophagosomalen Abbau und der funktionalen MHCI-Präsentation Chlamydien-infizierter DCs beteiligt sind. Die essentielle Rolle dieser Schlüsselproteine des Aggrephagie- bzw. Mitophagieweges bestätigen weiterhin den simultanen auto-/xenophagosomalen Abbau defekter Mitochondrien und desintegrierter Chlamydien in infizierten DCs.

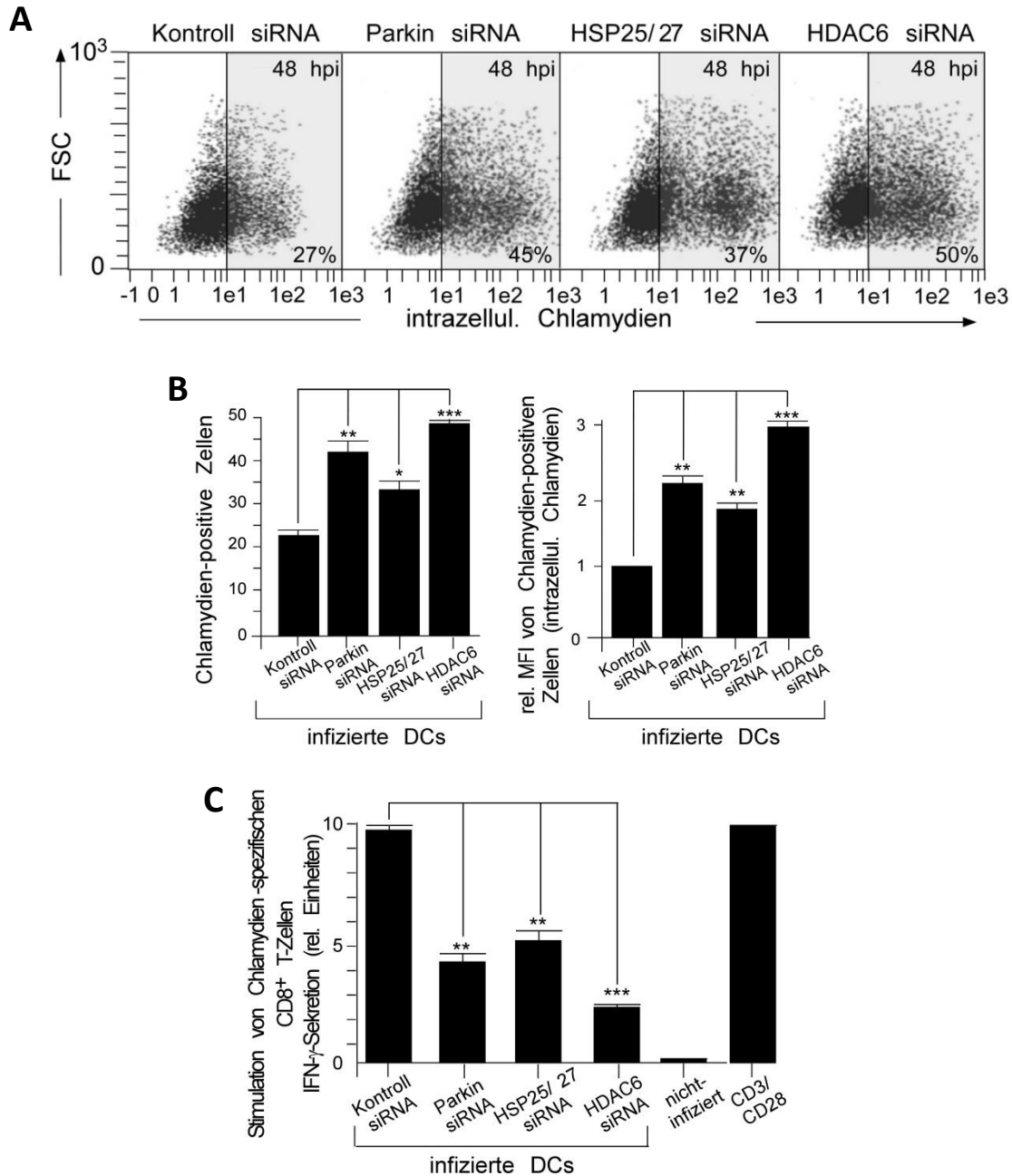


Abb. 4-23 Auswirkung der KD auf die Infektion und T-Zellaktivierung

JAWSII-Zellen wurden mit Parkin-, HSP25/27- oder HDAC6-siRNA transfiziert und 6 h später für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert. (A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse siRNA-transfizierter DCs mittels IMAGEN-Kit. (B) Mittelwerte des Anteils infizierter Zellen (%) (links) sowie der MFI (rechts) aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die MFI für Kontroll-siRNA transfizierte JAWSII-Zellen wurde auf 1 gesetzt. (C) Dargestellt ist die relative IFN- γ -Sekretion Chlamydien-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach 48 h Co-Kultivierung mit Kontroll- bzw. Parkin-, HSP25/27- und HDAC6-siRNA-transfizierten DCs. 24 hpi erfolgte die Zugabe der CD8⁺ T-Zellen in einem Verhältnis von DCs:T-Zellen von 1:6. Nach 48 h Co-Kultivierung wurde die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen mittels IFN- γ -ELISA gemessen. Als Positivkontrolle wurden CD8⁺ T-Zellen mit anti-CD3-/CD28-konjugierten Dynabeads kultiviert. Die IFN- γ -Sekretion ist dargestellt als relative Einheiten, wobei die Positivkontrolle auf 10 gesetzt wurde. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n = 3$).

4.1.8 Autophagosomaler Abbau von Chlamydien in primären DCs

Um auszuschließen, dass es sich bei dem im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Mechanismus der anti-chlamydialen Abwehr von infizierten DCs um ein rein Zelllinien-spezifisches Phänomen handelt, wurden in ergänzenden Untersuchungen primäre BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen isoliert und diese mittels Immunfluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der chlamydialen Infektion (Abb. 4-24 A) sowie der Assoziation chlamydialer Strukturen mit Proteinen des Aggrephagie- bzw. Mitophagieweges untersucht (Abb. 4-24 B).

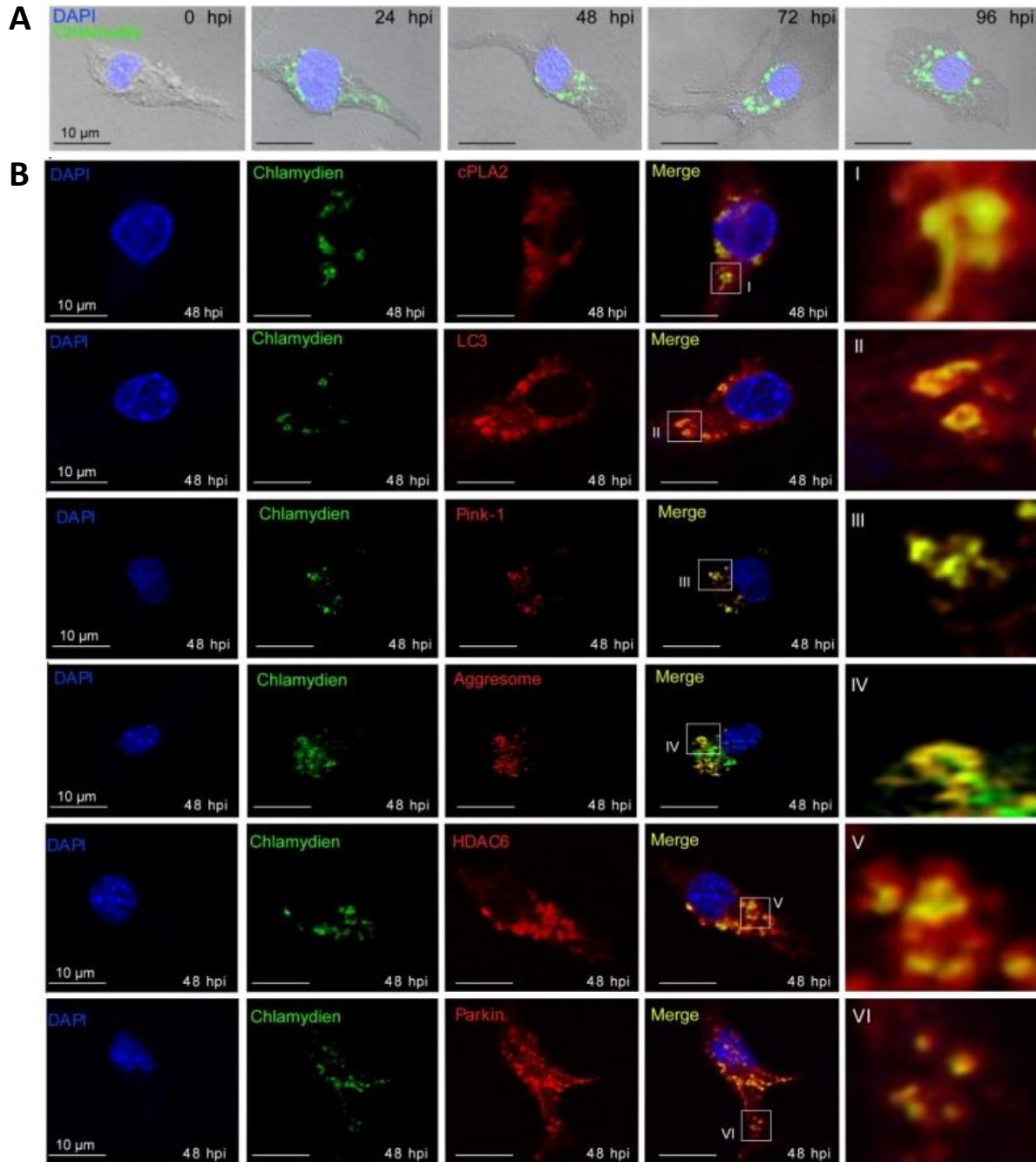


Abb. 4-24 Autophagie in infizierten BMDCs

(A) *C. psittaci*-infizierte primäre BMDCs (MOI 10, 0-96 hpi) wurden für intrazelluläre chlamydiale Strukturen (grün) und DNA (DAPI, blau) angefärbt. (B) Infizierte primäre BMDCs (48 hpi) wurden für cPLA2, LC3, Pink-1, Aggresomen, HDAC6 oder Parkin (rot), chlamydiale Strukturen (grün) und DNA (DAPI, blau) angefärbt. Vergrößerte Bildausschnitte (I-VI) zeigen die Co-Lokalisation von autophagosomalen Proteinen und Chlamydien.

Wie in Abb. 4-24 A zu sehen ist, waren primäre BMDCs ebenfalls mit *C. psittaci* infizierbar, wobei sich die Infektion durch das Vorhandensein multipler, sehr kleiner Inklusionen auszeichnete; äquivalent zu dem Phänotyp infizierter JAWSII-Zellen. Abb. 4-24 B zeigt weiterhin eine starke Co-Lokalisation

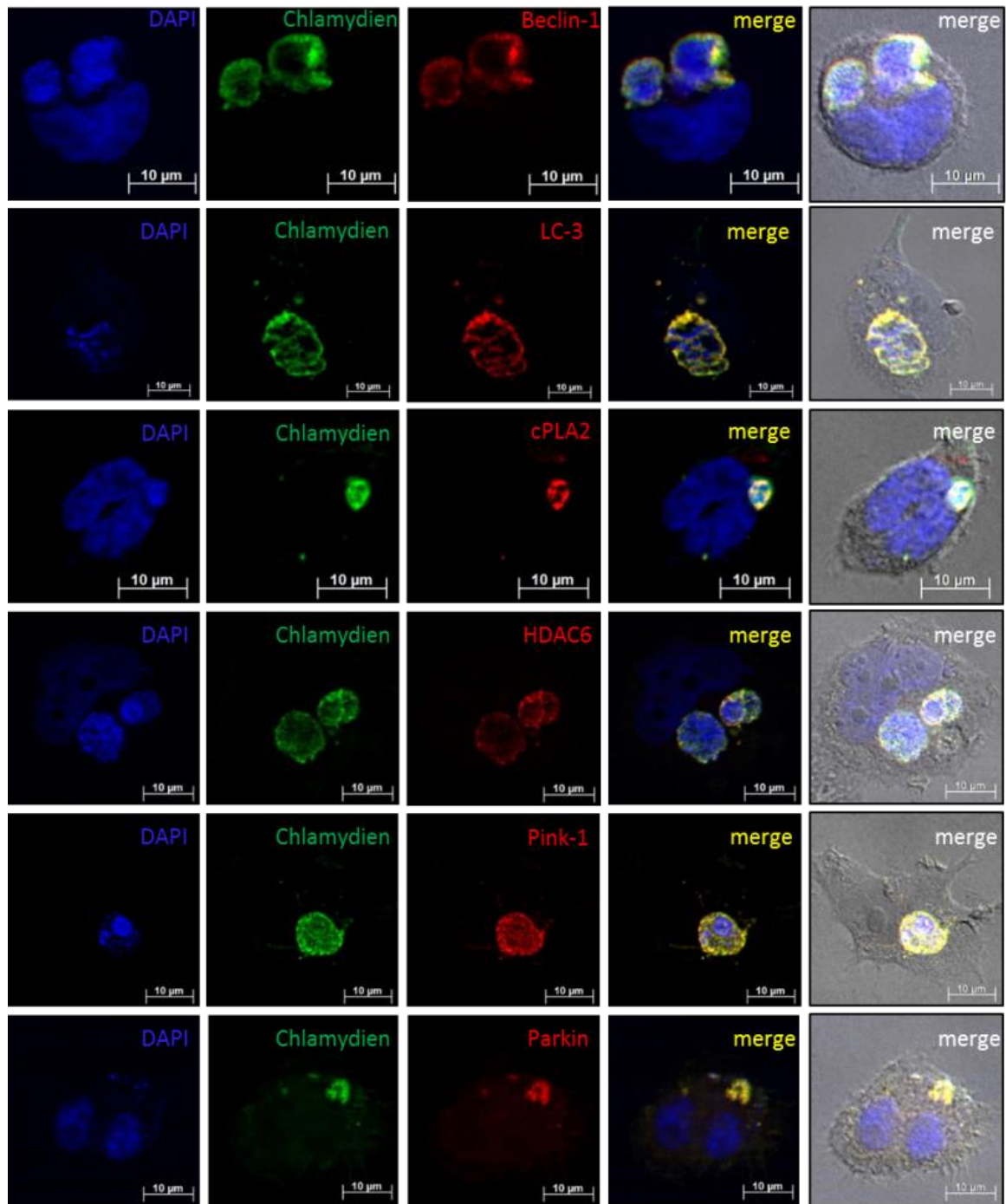
chlamydialer Strukturen mit cPLA2, was ein erstes Indiz für eine Desintegration der chlamydialen Inklusionen ist. Des Weiteren waren die chlamydialen Strukturen in primären BMDCs mit allen bedeutenden Proteinen des Aggrephagie- bzw. Mitophagieweges assoziiert. Außerdem konnte die Rekrutierung von LC3 an die chlamydialen Inklusionen gezeigt werden, was davon ausgehen lässt, dass die aggregierten und ubiquitinierten mitochondrialen und chlamydialen Strukturen tatsächlich dem autophagosomalen Abbau zugeführt werden. Folglich liefern diese Ergebnisse erste Hinweise für einen entsprechenden Ablauf der anti-chlamydialen Autophagie von primären BMDCs.

4.1.9 Autophagosomaler Abbau in humanen DCs

In Erweiterung der bisher durchgeführten Studien mit murinen DCs wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht, ob sich der gefundene Abwehrmechanismus auch auf das humane DC-System übertragen lässt. Um einen entsprechenden experimentellen Hinweis hierauf zu erhalten, wurden, ähnlich wie für primäre BMDCs, immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit funktionsrelevanten Autophagie-/Aggrephagieproteinen durchgeführt. Dafür wurde neben dem Erreger *C. psittaci* (Abb. 4-25 A) zusätzlich der humanpathogene Chlamydienstamm *C. trachomatis* LGV2 (Abb. 4-25 B) für die Infektionen der humanen myeloiden DC-Zelllinie KG-1 (Berges et al. 2005), (2.1.2) eingesetzt.

A

C. psittaci



B *C. trachomatis* LGV2

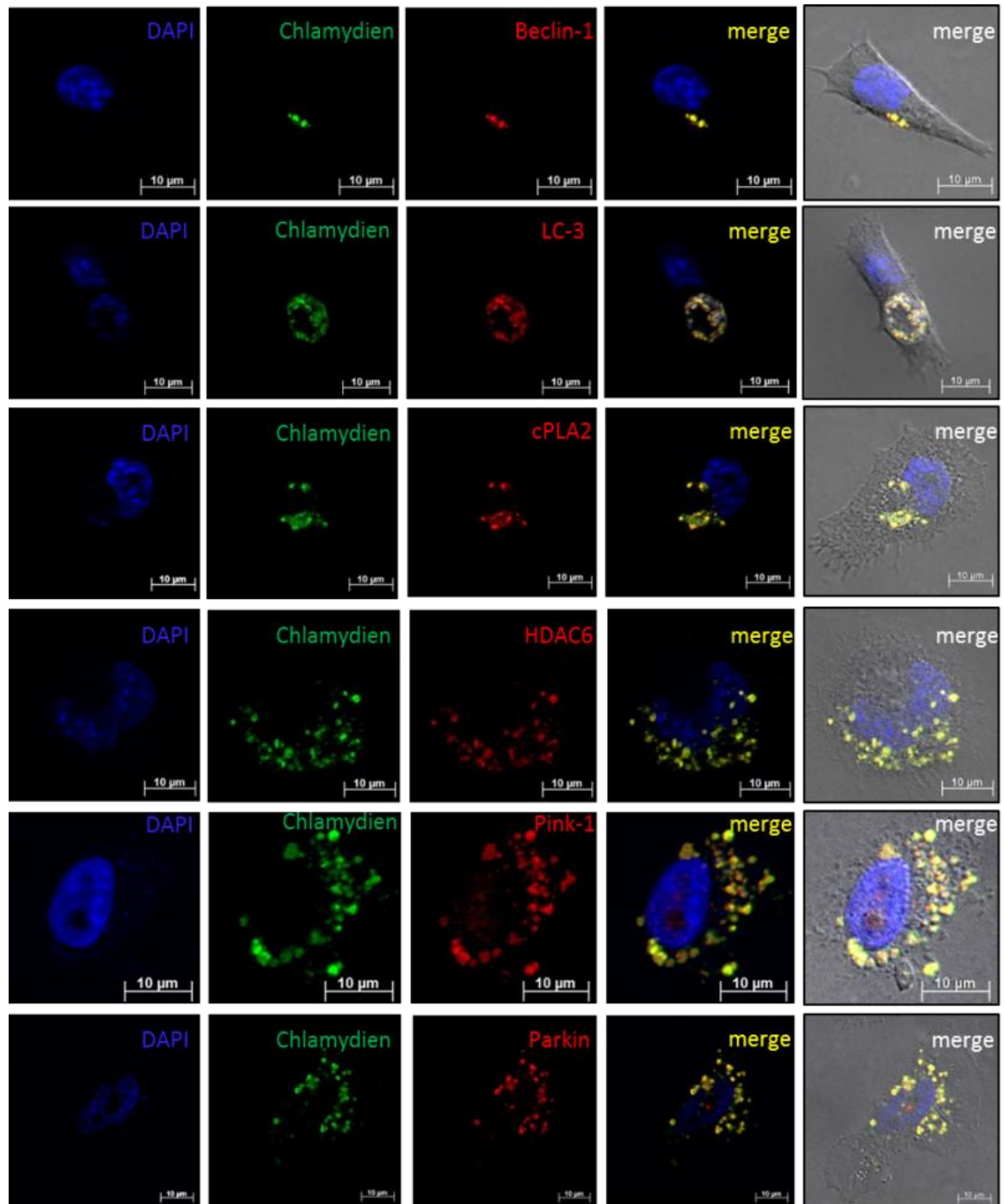


Abb. 4-25 Autophagie in infizierten humanen DCs

C. psittaci- (A) und *C. trachomatis* LGV2- (B) infizierte humane DCs (KG-1-Zellen) (MOI 10, 48 hpi) wurden für intrazelluläre chlamydiale Strukturen (grün) Beclin-1, LC-3, cPLA2, HDAC6, Pink-1 oder Parkin (rot) und DNA (DAPI, blau) angefärbt.

Wie in Abb. 4-25 ersichtlich, waren humane DCs mit *C. psittaci* (A) und *C. trachomatis* LGV2 (B) infizierbar. Des Weiteren konnte sowohl für *C. psittaci* als auch *C. trachomatis* LGV2 eine deutliche Assoziation mit den Autophagiemarkern Beclin-1 und LC3, sowie weiteren bedeutenden Proteinen des aggresomalen/mitophagosomalen Wegs gezeigt werden. Während die Infektion mit *C. trachomatis* LGV2 (Abb. 4-25 B) sich durch das Vorhandensein multipler, kleiner chlamydialer Strukturen auszeichnete, wie sie bereits für die *C. psittaci*-Infektion von JAWSII-Zellen sowie primäre BMDCs (Abb. 4-24) gezeigt werden konnte, schienen die chlamydialen Strukturen von *C. psittaci* (Abb. 4-25 A) noch relativ groß und intakt zu sein. Obwohl auch desintegrierte Inklusionen bei *C. psittaci*-infizierten DCs sichtbar waren, hatten die bakteriellen Strukturen hier eine Größe von ca. 10 µm und waren teilweise Kern-nah lokalisiert. Dies lässt vermuten, dass die autophagosomale Degradation der beiden Chlamydienstämme in infizierten humanen DCs mit unterschiedlicher Effizienz und Geschwindigkeit abläuft. In Zusammenfassung geben diese Ergebnisse einen ersten Hinweis für einen vergleichbaren intrazellulären Ablauf der anti-chlamydialen Abwehr in murinen und humanen DCs. Die beobachteten morphologischen Charakteristika und Unterschiede der *C. trachomatis*- und *C. psittaci*-infizierten humanen DCs lassen, wie bereits andere Studien (Braukmann et al. 2012), (Lyons et al. 2005), (Haldar et al. 2016) auf mögliche strukturelle und funktionale Unterschiede in der speziesspezifischen Wechselwirkung zwischen infizierten Wirtszellen und den verschiedenen Chlamydienstämmen schließen.

4.2 Rolle von DC-stämmigen Exosomen in der anti-chlamydialen Abwehr

Parallel zur Aggregatbildung konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen infizierter DCs auch eine vermehrte Entstehung von Vesikeln, darunter Multivesikularkörperchen (MVBs), beobachtet werden (Abb. 4-26 A). MVBs stellen eine besondere Form später Endosomen dar, die durch Einstülpung endosomaler Membranen in ihr Lumen entstehen. Durch Fusion mit der Plasmamembran setzen MVBs, die in ihrem Lumen akkumulierenden Vesikel, als sogenannte Exosomen frei (Simons and Raposo 2009). Exosomen repräsentieren eine Population von Membranvesikeln, die eine homogene Größe (30-200 nm) und Gestalt aufweisen (Melo et al. 2015). Die Bildung von Exosomen konnte für die verschiedensten Zelltypen nachgewiesen werden, darunter u.a. B- und T-Lymphozyten (Raposo et al. 1996, Blanchard et al. 2002), dendritische Zellen (Zitvogel et al. 1998), jedoch auch für nicht Immunzellen, wie beispielsweise Epithelzellen (van Niel et al. 2001). Insbesondere DC-stämmige Exosomen (Dexosomen) haben in den letzten 10 Jahren ein besonderes Interesse geweckt, da sie sich durch einen sehr charakteristischen Proteininhalt, mit einem hohen Anteil aller bekannten Antigen-präsentierenden Moleküle, insbesondere MHCI und MHCII, auszeichnen (Zitvogel et al. 1998), und somit zur Verbreitung und Verstärkung der zellulären Immunantwort beitragen können (Thery, Ostrowski, and Segura 2009). Aufgrund der Beobachtung, dass es in DCs im Infektionsverlauf zu einer vermehrten Bildung von Exosomen-produzierenden MVBs kommt, wurde untersucht, ob exosomale Membranvesikel eine funktionale Rolle in der anti-chlamydialen Abwehr spielen.

4.2.1 Isolation und Charakterisierung von Exosomen

Um zu untersuchen, ob die vermehrte MVB-Bildung in infizierten DCs auch tatsächlich mit einer erhöhten Freisetzung von vesikulärem Material einhergeht, wurden im Folgenden zunächst die exosomalen Überstände infizierter (48 hpi) und nicht-infizierter DCs hinsichtlich ihres Proteinanteils analysiert. Dafür wurden die im Überstand befindlichen Membranvesikel zunächst mittels *ExoQuick-TC*-Kit der Firma System Biosciences aufgereinigt, in der SDS-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend durch Coomassie angefärbt. Wie in Abb. 4-26 C ersichtlich, führte die Infektion von DCs zu einer massiven Freisetzung von exosomalen Proteinen in den Zellkulturüberstand, wohingegen für nicht infizierte Zellen nur ein Bruchteil entsprechender Proteine freigesetzt wurde. Auffällig war, dass die exosomalen Proteine, die besonders stark im Überstand infizierter Zellen akkumulierten, ebenfalls in nicht-infizierten Zellen vorkamen. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die Infektion von DCs zu einer erhöhten Freisetzung von Vesikeln

führt, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung jedoch kaum merklich von solchen nicht-infizierter Zellen zu unterscheiden scheinen. Um genauere Schlüsse über die Freisetzung von Exosomen infizierter und nicht-infizierter Zellen ziehen zu können, wurden in anschließenden Western-Blot-Analysen zum einen die Überstände infizierter (48 hpi) und nicht-infizierter DCs, zum anderen aus dem Überstand isolierte Exosomen hinsichtlich des Exosomenmarkers Flotillin-1 untersucht. Die Isolation von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand infizierter (48 hpi) und nicht-infizierter DCs erfolgte mithilfe des *ExoQuick-TC*-Kits. Wie in Abb. 4-26 D zu sehen, kam es sowohl im gesamten Zellkulturüberstand infizierter DCs, als auch in der Exosomenfraktion zu einer massiven Flotillin-1-Akkumulation im Vergleich zu Überständen bzw. Exosomen nicht-infizierter Zellen. Setzt man die Flotillin-Menge mit der Menge freigesetzter Exosomen gleich, so kann man schlussfolgern, dass es während der Infektion von DCs zu einer 5-fach erhöhten Exosomenfreisetzung kommt (Abb. 4-26 D, rechts). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten, die aus dem Zellkulturüberstand infizierter DCs (48 hpi) isolierten Exosomen, die im Folgenden der Einfachheit halber als iDexosomen bezeichnet werden, außerdem visualisiert werden. Wie in Abb. 4-26 B zu sehen, variierten die Vesikel stark in ihrer Größe, befanden sich jedoch in einer Größenordnung von 30-200 nm, was dem für Exosomen beschriebenen Größenbereich entspricht (Hannafon and Ding 2013).

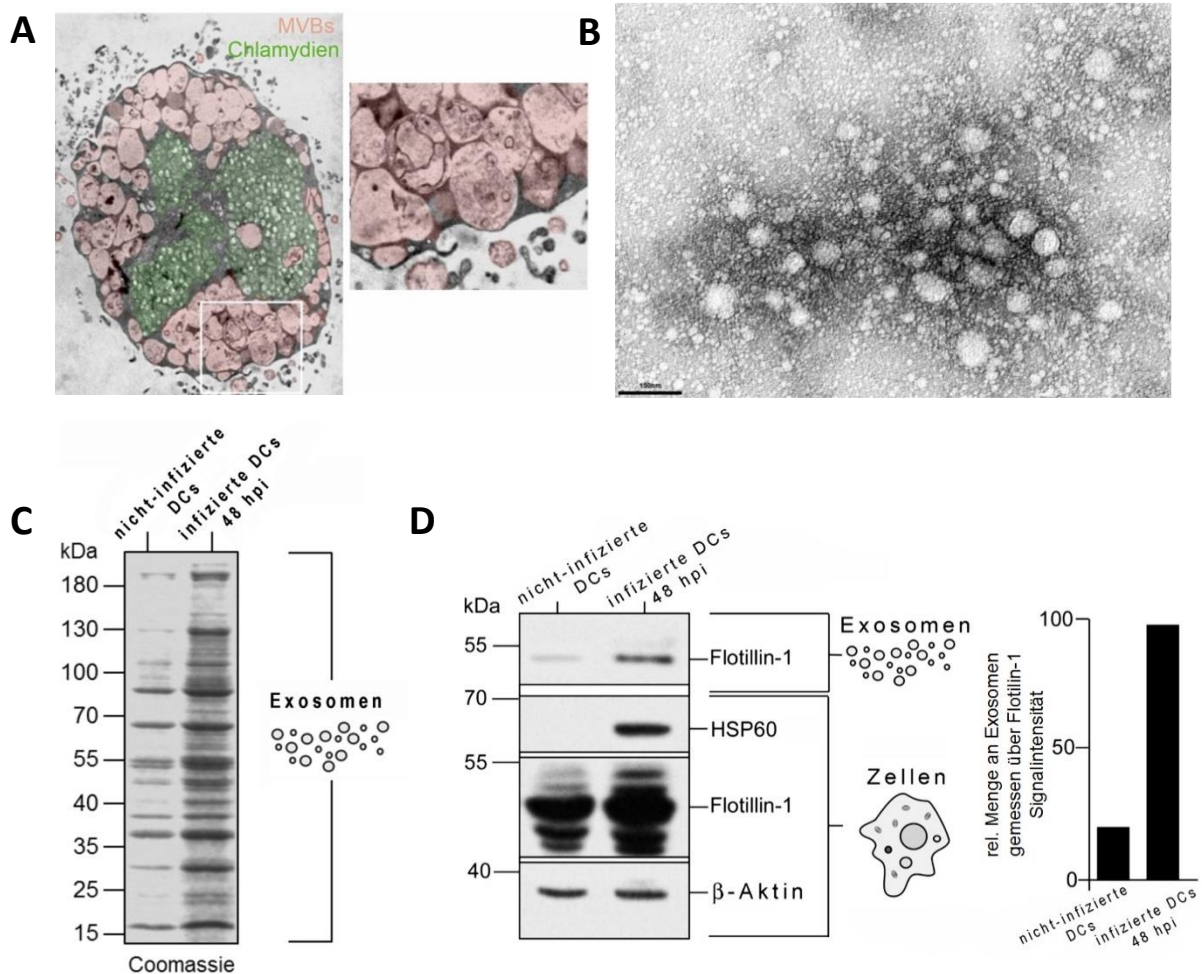


Abb. 4-26 Isolation von Exosomen aus infizierten DCs

(A) TEM-Aufnahme einer *C. psittaci*-infizierten JAWSII-Zelle (MOI 10, 48 hpi). Chlamydiale Strukturen wurden nachträglich in grün, vesikuläre Strukturen, darunter u.a. MVBs, in rosa angefärbt. Die rechte Abbildung zeigt eine vergrößerte Ansicht des links eingerahmten Bildausschnitts. (B) TEM-Aufnahme von iDexosomen. (C) Coomassie-Gel zum quantitativen Vergleich der von nicht-infizierten und infizierten DCs in den Zellkulturüberstand freigesetzten exosomalen Proteine. (D) Western-Blot-Analyse zur quantitativen Bestimmung des Exosomenmarkers Flotillin-1 in isolierten Exosomen (*ExoQuick-TC-Kit*) sowie den Zellkulturüberständen infizierter und nicht-infizierter DCs (links). Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von Flotillin-1 in der Exosomenfraktion infizierter und nicht-infizierter Zellen bestimmt und miteinander verglichen. Dafür wurde die Bandenintensität für Flotillin-1 in iDexosomen auf 100 gesetzt (rechts).

Bevor die Funktion von Exosomen während der anti-chlamydialen Abwehr untersucht wurde, erfolgte zunächst eine massenspektrometrische Analyse um die Proteinzusammensetzung (zellulär und bakteriell), der mithilfe des *ExoQuick-TC-Kits*, aufgereinigten Exosomen zu bestimmen. Dafür wurden JAWSII-Zellen zunächst durch die ^{13}C -markierten Isotopomere von Arginin und Lysin metabolisch markiert, bis ein vollständiger Austausch stattgefunden hatte. Hierfür erfolgte die Kultivierung der Zellen in Medium mit Exosomen-freiem FCS. Anschließend wurden die Zellen mit Chlamydien infiziert und die isolierten Exosomen 48 hpi mittels nLC MALDI-TOF/TOF MS analysiert.

Abschließend wurden die ermittelten Peptide mit der GO Annotation Datenbank und den exosomal Einträgen der Exosomendatenbank ExoCarta verglichen. Der Datenabgleich lieferte das mithilfe der Software STRING (Szklarczyk et al. 2017) in Abb. 4-27 A abgebildete Interaktom, welches die Interaktion der insgesamt 365 schwer-markierten identifizierten exosomal Proteine veranschaulicht. Bei den 267 rot markierten Proteinen handelt es sich um solche, die durch die GO Annotation Datenbank als exosomale Proteine annotiert sind. Grau markierte Proteine sind nicht durch die genannte Datenbank annotiert, stellen jedoch ebenfalls exosomale Proteine dar. Tab. 4.1 fasst einige der identifizierten typischen exosomal Markerproteine zusammen. Darunter befanden sich u.a. Proteine für das *Targeting* und die Adhäsion, wie verschiedene Annexine und diverse Rab-Proteine für den Membrantransport sowie die –fusion. Des Weiteren wurden Enzyme wie GAPDH und verschiedene ATPasen, Zytoskelettelemente (Aktin, Tubulin, Clathrin), Transkriptionsfaktoren (Elongationsfaktor 2) sowie das Tetraspanin CD9 identifiziert. Chlamydiale Proteine konnten hier nicht nachgewiesen werden- lediglich ein einziges bakterielles Porin war mit einer Häufigkeit von nur 2 möglichen chlamydialen Peptidkandidaten vertreten. Dies lässt eher auf eine geringfügige Kontamination, als auf eine reale Anwesenheit chlamydialer Polypeptide in Exosomen schließen. Mithilfe der MS-Analyse konnte somit eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei dem, aus dem Überstand infizierter DCs, isolierten Material um Exosomen und nicht um anderweitige Mikrovesikel handelte.

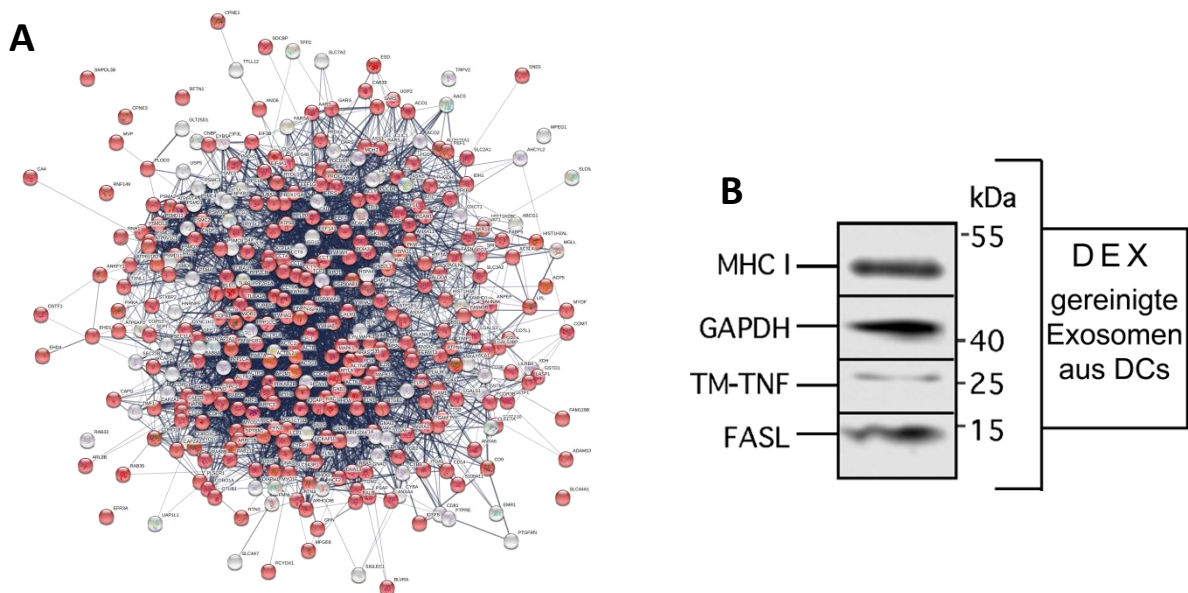


Abb. 4-27 Identifizierung exosomaler Proteine infizierter DCs

(A) Durch nLC-MALDI-TOF/TOF-MS-Analysen und Abgleich der erhaltenen Peptide mit der GO-Annotation- sowie ExoCarta-Datenbank erhaltenes Interaktom. Dargestellt sind die Protein-Protein-Interaktionen GO-annotierter (rot) und nicht durch die GO-Annotation-Datenbank annotierter identifizierter exosomal Proteine infizierter DCs (B) Western-Blot-Analyse zum Nachweis exosomaler Oberflächenproteine. Exosomen wurden mithilfe des *ExoQuick-TC-Kits* aus dem Überstand *C. psittaci*-infizierter JAWSII-Zellen (MOI 10, 48 hpi) isoliert, lysiert und anschließend im Western-Blot eingesetzt. DEX: Dexosomen.

Tab. 4.1 Ausgewählte exosomale Markerproteine

Zugangsnr.	Gen Name	Protein
P63260	Actg1	Aktin, zytoplasmatisch 2
P97429	Anxa4	Annexin A4
Q8VDN2	Atp1a1	Na/K-transp. ATPase UE α -1
P50516	Atp6v1a	V-type Protonen ATPase katalytische UE A
P40240	Cd9	CD9-Antigen
Q68FD5	Cltc	Clathrin schwere Kette
P10605	Ctsb	Cathepsin B
P58252	Eef2	Elongationsfaktor 2
S4R257	Gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Fragment)
P11499	Hsp90ab1	<i>heat shock protein</i> HSP90- β
G3UZD3	Rab11b	Ras-verwandtes Protein Rab-11B
P35278	Rab5c	Ras-verwandtes Protein Rab-5C
P51150	Rab7a	Ras-verwandtes Protein Rab-7a
P99024	Tubb5	Tubulin β -5 Kette

vollständige Tabelle s. Anhang

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich Dexosomen insbesondere durch ihren hohen Anteil Antigen-präsentierender Moleküle wie MHCI und MHCII aus (Zitvogel et al. 1998). Weiterhin wird beschrieben, dass Dexosomen Apoptose-induzierende Moleküle auf der Oberfläche tragen können (Munich et al. 2012). Um weitere bekannte exosomale Proteine, die durch die Massenspektrometrie nicht erfasst wurden, nachzuweisen, wurden zusätzlich Western-Blot-Analysen mit isolierten iDexosomen durchgeführt. Wie in Abb. 4-27 B ersichtlich, konnte in isolierten iDexosomen sowohl MHCI, als auch transmembrangebundenes TNF- α (TM-TNF) sowie der Fas-Ligand (FasL) nachgewiesen werden. Damit ist sowohl eine Rolle von iDexosomen in der Verstärkung und Verbreitung der Immunantwort während der Chlamydieninfektion sowie eine Funktion in der Apoptoseinduktion denkbar.

4.2.2 Infektiosität von Dexosomen

Zunächst wurde jedoch eine mögliche Beteiligung von iDexosomen zugunsten chlamydialer Infektionen untersucht. Für Exosomen, die in Folge der chlamydialen Infektion von Epithelzellen freigesetzt werden, wird eine Rolle in der Verbreitung chlamydialer Proteine postuliert. Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus dazu dient, bakterielle Virulenzfaktoren in Nachbarzellen zu transportieren, um die chlamydiale Pathogenese zu fördern (Frohlich et al. 2012). Da jedoch in DCs im Gegensatz zu Epithelzellen kein vollständiger Entwicklungszyklus der Chlamydien stattfindet, sondern die Bakterien mithilfe des Autophagieweges degradiert werden (Radomski, Kagebein, et al.

2017), (Radomski, Rebbig, et al. 2017), ist davon auszugehen, dass eine exosomale „Verpackung“ chlamydialer Virulenzfaktoren in DCs nicht stattfindet. Es wäre jedoch durchaus denkbar, dass die in einem frühen Entwicklungsstadium verbleibenden Chlamydien, vollständig in Dexosomen aufgenommen werden und somit zu einer Verbreitung der Infektion beitragen. Da chlamydiale EBs einen Durchmesser von 200 - 300 nm aufweisen, wäre eine vollständige Aufnahme dieser in Exosomen möglich. Um zu untersuchen, ob Dexosomen infektiöses Material beinhalten, wurden diese zunächst aus dem Überstand infizierter DCs (48 hpi) isoliert, im Folgenden zu BGM-Reporterzellen titriert und 48 h später die Infektion mittels Durchflusszytometrie gemessen. Parallel dazu wurden isolierte Exosomen aus infizierten und nicht-infizierten DCs hinsichtlich der Präsenz von chlamydialem LPS hin untersucht.

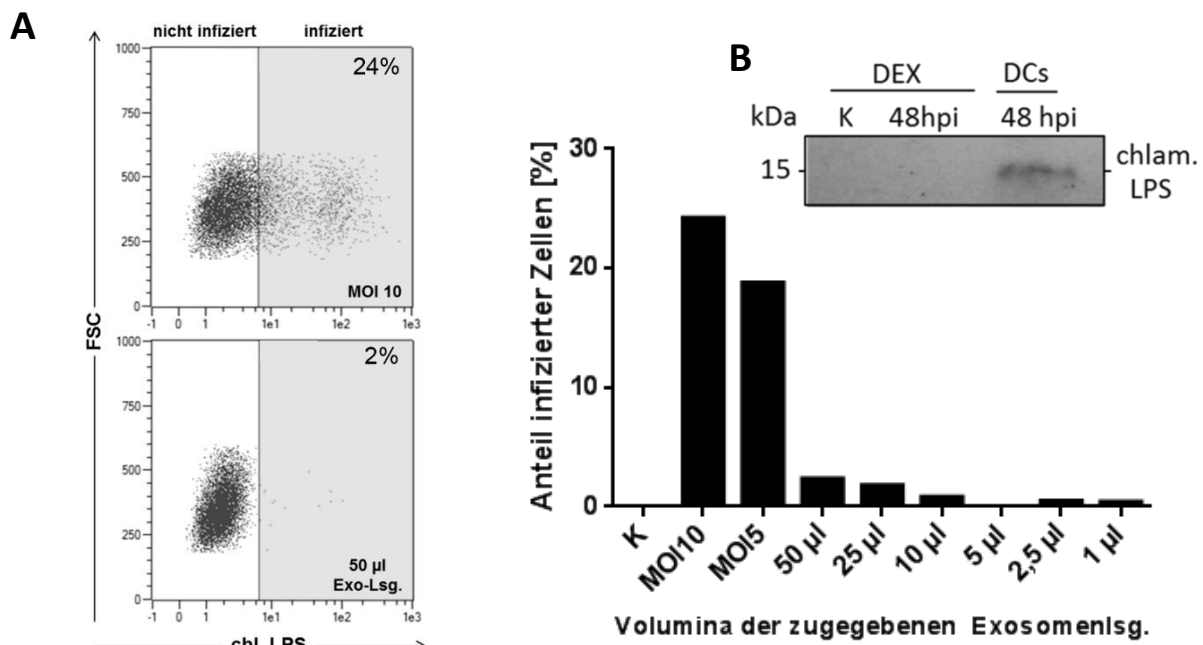


Abb. 4-28 Infektiosität von Dexosomen

(A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Infektion von BGM-Zellen nach iDexosomen-Behandlung (50 µl Exosomenlösung) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (links). Quantitative Analyse Chlamydien-positiver Zellen nach Infektion von BGM-Zellen mit *C. psittaci* (Positivkontrolle), sowie nach Titration mit unterschiedlichen Volumina an Exosomenlösung (rechts). Exosomen wurden mithilfe des *ExoQuick-TC-Kits* aus dem Überstand *C. psittaci*-infizierter JAWSII-Zellen (MOI 10, 48 hpi) isoliert, das Pellet in PBS aufgenommen und die Exosomenlösung anschließend in unterschiedlichen Volumina für 48 h auf BGM-Zellen gegeben. Die Ermittlung des Anteils infizierter Zellen erfolgte unter Verwendung des *IMAGEN-Kits*. (B) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung von chlamydialem LPS (chl. LPS) in Exosomen aus dem Überstand *C. psittaci*-infizierter (MOI 10, 48 hpi) und nicht-infizierter JAWSII-Zellen (DEX). Als Positivkontrolle diente ein Zell-Lysat infizierter JAWSII-Zellen (DCs). Chl. LPS: chlamydiales LPS, Exo-Lsg.: Exosomenlösung, DEX: Dexosomen, K: Kontrolle.

Wie in Abb. 4-28 A zu sehen, war bereits bei der Zugabe eines Volumens von 50 µl Exosomenlösung, was einem Verhältnis der Zellzahl von DCs aus deren Überstand die Exosomen isoliert wurden und der Zellzahl der damit behandelten BGM-Zellen von 8:1 entsprach, nur ein vernachlässigbarer Anteil

von $\leq 2\%$ infizierter Zellen zu verzeichnen. Bei geringeren Volumina an zugegebener Exosomenlösung sank der Anteil infizierter Zellen bis in den kaum noch messbaren Bereich ab. Die beobachtete marginale Infektionsrate der Zellen ist möglicherweise auf eine geringfügige Kontamination der Exosomenlösung mit außerhalb der Exosomen befindlichen Chlamydien zurückzuführen, da durch das eingesetzte Kit extrazelluläre Vesikel ausschließlich anhand ihrer Größe isoliert werden und Chlamydien sich in der gleichen Größenordnung wie Exosomen befinden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der massenspektrometrischen Analyse (Abb. 4-27), bei der keine relevanten Mengen chlamydialer Proteine nachgewiesen wurden. Dass iDexosomen keine Chlamydien beinhalten, konnte weiterhin mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Wie in Abb. 4-28 B deutlich zu erkennen, konnte in iDexosomen, im Gegensatz zu einem Kontroll-Lysat infizierter DCs, kein chlamydiales LPS nachgewiesen werden. Zusammen sprechen die Ergebnisse gegen eine mögliche „Verpackung“ von Chlamydien in Exosomen und damit gegen eine Exosomen-vermittelte Verbreitung der Infektion von Zelle zu Zelle.

4.2.3 CD95-vermittelte Apoptose durch Exosomen

Von Exosomen, die von Tumorzellen freigesetzt werden, ist bekannt, dass sie die T-Zellantwort supprimieren, indem sie vermittelt durch CD95L/CD95-Interaktion Apoptose in T-Zellen induzieren (Abusamra et al. 2005). Auch für Dexosomen konnte gezeigt werden, dass diese FasL auf der Oberfläche exprimieren und durch FasL/FasR (CD95)-Interaktion Apoptose in Tumorzellen induzieren (Munich et al. 2012). Wie bereits in Kapitel 4.2.1 gezeigt, konnte mithilfe von Western-Blot-Analysen FasL in Exosomen Chlamydien-infizierter DCs nachgewiesen werden (Abb. 4-27 B). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die von infizierten DCs freigesetzten Exosomen ebenfalls in der Lage sind, in Epithelzellen, den Zielzellen der Chlamydien, FasL/FasR-vermittelte Apoptose zu induzieren. Dafür wurde zunächst überprüft, ob die eingesetzten Epithelzellen (MN-R-Zellen) den Fas-Rezeptor exprimieren. Zu diesem Zweck wurden Epithelzellen mit Chlamydien infiziert und zu den entsprechenden Infektionszeitpunkten (24-72 hpi) die CD95-Oberflächenexpression der Zellen mittels Durchflusszytometer bestimmt. Wie in Abb. 4-29 A zu sehen, zeigten MN-R-Zellen über den gesamten Infektionszeitraum von 72 h eine konstante CD95-Oberflächenexpression, wodurch eine Apoptoseinduktion von Seiten der Dexosomen möglich wäre. Um dieser Hypothese experimentell nachzugehen, wurden Exosomen aus dem Zellkulturüberstand infizierter (48 hpi) DCs isoliert und nachfolgend in einem Verhältnis von Donor-:Akzeptorzellzahl von 1:1 zu nicht-infizierten und 48 h vorinfizierten Epithelzellen gegeben. Weitere 48 h später wurde dann der Anteil apoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie mittels Annexin-V-Anfärbung bestimmt (Abb. 4-29 B, C).

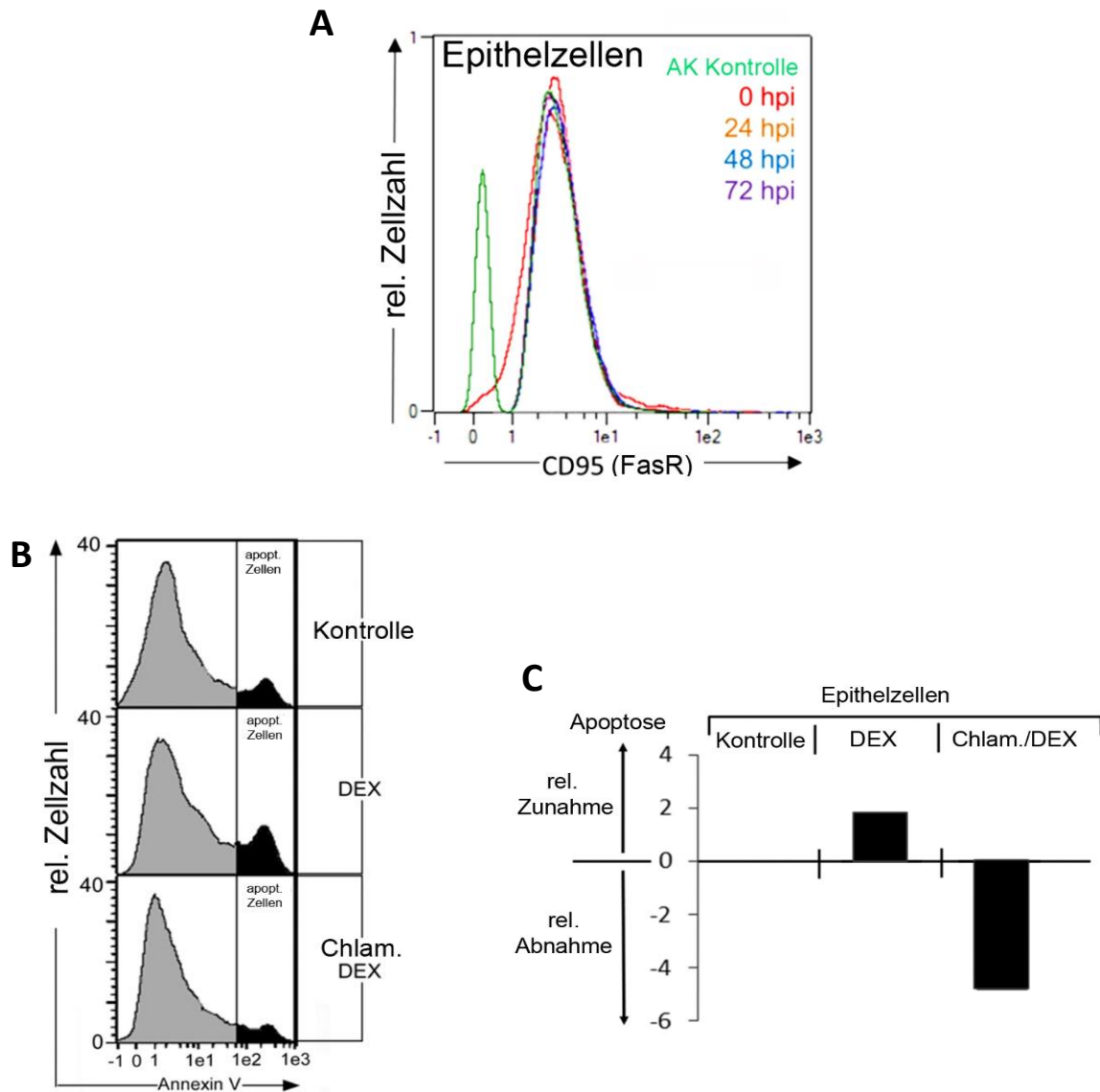


Abb. 4-29 CD95-vermittelte Apoptose durch iDexosomen

(A) Durchflusszytometrische Analyse der CD95-Oberflächenexpression infizierter Epithelzellen. MN-R-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 h mit *C. psittaci* infiziert (MOI 20) oder blieben nicht infiziert. Für die Antikörper-Kontrolle (AK Kontrolle) wurden die Zellen lediglich mit dem Primär-Antikörper inkubiert. (B) Dargestellt ist die durchflusszytometrische Messung der Apoptose-Induktion iDexosomen behandelter Epithelzellen. MN-R-Zellen wurden für 48 h mit *C. psittaci* infiziert (MOI 20) oder blieben nicht infiziert. Anschließend erfolgte die 48 h Inkubation der Zellen mit Exosomen, die zuvor aus dem Zellkulturüberstand *C. psittaci* infizierter JAWSII-Zellen (MOI 10, 48 hpi) isoliert wurden. Die Exosomen wurden in einem Verhältnis von Donor-Akzeptorzellzahl von 1:1 eingesetzt. Die Messung der Apoptoseinduktion erfolgte unter Verwendung des Annexin-V-FITC-Kits (Miltenyi). (C) Dargestellt ist die relative Zunahme bzw. Abnahme der Anzahl apoptotischer Zellen nicht-infizierter (DEX) und infizierter (Chlam./DEX) Exosomen-behandelter MN-R-Zellen im Vergleich zu nicht behandelten, nicht-infizierten Kontrollzellen. Chlam.: Chlamydien, DEX: Dexosomen.

Wie in Abb. 4-29 B und C ersichtlich, führte die Behandlung nicht-infizierter Epithelzellen mit iDexosomen zu einer deutlich messbaren Apoptoseinduktion um den Faktor 2 im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Für vorinfizierte Epithelzellen konnte durch die iDexosomen-Behandlung jedoch

keine erhöhte Apoptoserate beobachtet werden. Hier kam es sogar zu einer, um den Faktor 5 reduzierten, Apoptoseinduktion im Vergleich zu nicht-infizierten, unbehandelten Epithelzellen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Chlamydien in der Lage sind, eine exosomale über FasL/FasR-vermittelte Apoptose in infizierten Epithelzellen zu unterdrücken.

4.2.4 Einfluss von Exosomen auf NK-Zellen

Für Exosomen Chlamydien-infizierter Epithelzellen wird postuliert, dass diese immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, die sie zur Stimulation von APCs befähigen (Russell 2018). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde in hier nicht dargestellten Untersuchungen gefunden, dass iDexosomen weder zu einer funktionalen Reifung, noch zu einer erhöhten MHC-I-Oberflächenexpression von DCs führen. Folglich scheint eine Aktivierung unreifer DCs durch iDexosomen nicht möglich zu sein. Basierend hierauf stellt sich jedoch die Frage, ob iDexosomen immunmodulatorische Eigenschaften auf andere Immunzellen haben. Interessanterweise konnte für Dexosomen im Mausmodell gezeigt werden, dass diese mittels TNF/TNF-Rezeptor-Interaktion direkt NK-Zellen aktivieren können (Munich et al. 2012). Da iDexosomen, wie bereits in Kapitel 4.2.1 anhand von Western-Blot-Analysen gezeigt (Abb. 4-27 B), transmembran-gebundenes TNF enthalten, wurde nachfolgend untersucht, ob die von infizierten DCs freigesetzten Exosomen ebenfalls zur NK-Zell-Aktivierung fähig sind. Dafür wurden Maus-NK-Zellen (muriner NK-Zellklon KY-2) für 48 h mit iDexosomen inkubiert und anschließend die IFN- γ -Sekretion mithilfe des Mouse IFN- γ Platinum ELISAs der Firma eBiosciences im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen analysiert (Abb. 4-30).

Ergebnisse

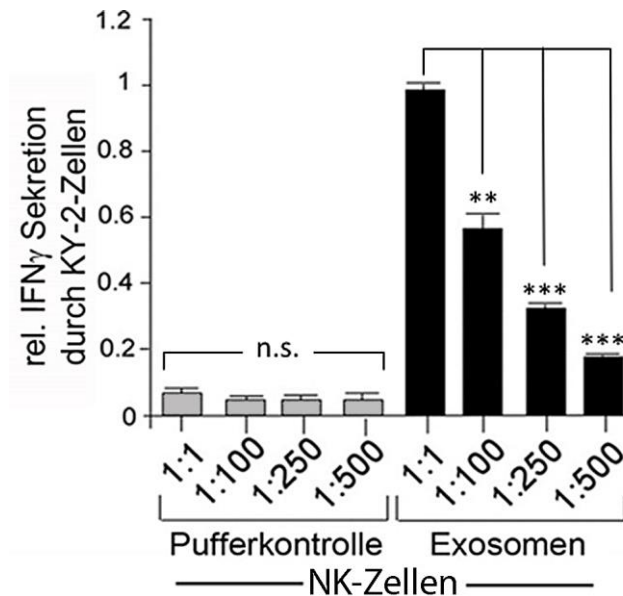


Abb. 4-30 Induktion der IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen durch iDexosomen

Dargestellt ist die relative IFN- γ -Sekretion iDexosomen-behandelter NK-Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. KY-2-Zellen wurden für 48 h mit iDexosomen inkubiert, wobei die Menge eingesetzter Exosomen einem Verhältnis von Donor-Akzeptorzellzahl von 1:1 entsprach. Für den IFN- γ -ELISA wurden verschiedene Verdünnungen der Zellkulturüberstände iDexosomen-behandelter (s. Exosomen) und nicht behandelter (s. Pufferkontrolle) NK-Zellen eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 450 nm aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die OD für iDexosomen-behandelte NK-Zellen (Verdünnung 1:1) wurde auf 1 gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (n.s.: nicht signifikant, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. 1:1-Verhältnis; $n=3$).

Wie in Abb. 4-30 deutlich zu sehen, führte die Behandlung von NK-Zellen mit iDexosomen zu einer starken Induktion der IFN- γ -Sekretion im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen. Durch Analyse der verschiedenen eingesetzten iDexosomen-Verdünnungen ist zudem erkennbar, dass die IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen direkt mit der Menge der zugegebenen Exosomenmenge korreliert. Folglich scheinen iDexosomen massiv zur Induktion der IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen und somit zur Aktivierung einer NK-Zellantwort während der Chlamydieninfektion beizutragen.

4.2.5 Funktionale Kooperation von TNF- α und IFN- γ in der Apoptose infizierter und nicht-infizierter Epithelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass iDexosomen zu einer massiven IFN- γ -Induktion von NK-Zellen führen, wurde nun untersucht, ob IFN- γ in An- und Abwesenheit von TNF- α und/oder Exosomen (beides von infizierten DCs produziert (Dorothee Fiegl, Dissertation und Abb. 4-26)) Einfluss auf die beobachtete exosomale Apoptose von Epithelzellen nimmt. Für IFN- γ wurde beschrieben, dass es

synergistisch den apoptotischen Effekt von TNF- α erhöht, indem es zum einen die Expression des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1) und Komplex II hochreguliert (Bode, Murch, and Freeze 2006) und zum anderen die Expression des TNF-Rezeptors 2 (TNFR2) und Komplex I herunterreguliert (Liu et al. 2011), wodurch der anti-apoptotische Effekt inhibiert wird. Des Weiteren wurde für IFN- γ eine Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 gezeigt (Cao et al. 2015). Um den Einfluss von IFN- γ auf die exosomale Apoptose von Epithelzellen zu untersuchen, wurden nicht-infizierte Epithelzellen mit TNF- α und IFN- γ alleine, sowie mit einer Kombination beider Zytokine behandelt. Des Weiteren wurde der Einfluss von Exosomen alleine, sowie der Dreifachbehandlung mit TNF- α , IFN- γ und Exosomen auf die Apoptoseinduktion von Epithelzellen mittels Annexin-V in der Durchflusszytometrie sowie durch Caspase-3-Spaltung in Western-Blot-Analysen untersucht (Abb. 4-31).

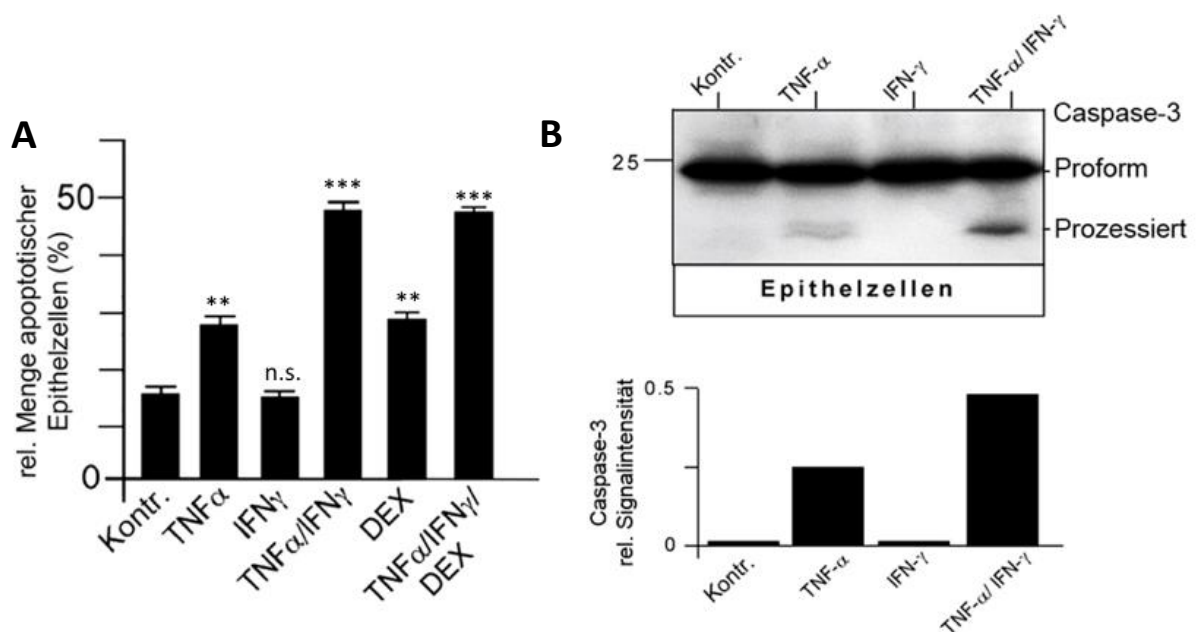


Abb. 4-31 Synergistischer Effekt von IFN- γ auf die TNF- α -induzierte Apoptose

(A) Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen nach 24 h Inkubation von Epithelzellen (MN-R) mit TNF- α (30 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und/oder iDexosomen (Donor:Akzeptorzellzahl 1:1) mittels Annexin-V-FITC-Kit. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (n.s.: nicht signifikant, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n=3$). (B) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Caspase-3-Spaltung nach 24 h Behandlung der Epithelzellen mit den verschiedenen Zytokinen (oben). Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten für pro-Caspase-3 und prozessierte Caspase-3 bestimmt. Dargestellt ist das Verhältnis der Bandenintensität von prozessierter/pro-Caspase-3 (unten).

Wie in Abb. 4-31 A zu sehen, führte die Behandlung von Epithelzellen mit TNF- α und Exosomen alleine zu einer deutlich erhöhten Anzahl apoptotischer (Annexin-V-positiver) Zellen (Faktor 1,8), wohingegen die Einfachbehandlung mit IFN- γ keinen Effekt erzielte. Wurden die Zellen jedoch mit

einer Kombination beider Zytokine oder einer Dreifachkombination aus TNF- α , IFN- γ und Exosomen behandelt, so konnte ein massiver Anstieg im Anteil apoptotischer Zellen beobachtet werden (Faktor 3,3). Da die jeweilige Zusatzbehandlung mit Exosomen keinen Effekt erzielte, ist davon auszugehen, dass TNF- α und Exosomen den gleichen Apoptoseweg bedienen. Auch in der Western-Blot-Analyse zur Caspase-3-Spaltung zeigte sich eine messbare Caspase-Prozessierung durch die alleinige Behandlung der Zellen mit TNF- α (Faktor 2,5), die durch die Zusatzbehandlung mit IFN- γ noch weiter gesteigert werden konnte (Faktor 5 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) (Abb. 4-31 B). Somit kann geschlussfolgert werden, dass eine Steigerung des apoptotischen Effekts in Epithelzellen vorwiegend durch den, über Exosomen vermittelten, kooperativen Effekt von TNF- α und IFN- γ verursacht wird.

Nachfolgend wurde untersucht, ob und in welchem Maße die Überstände (mit Exosomen, TNF- α und IFN- γ) co-kultivierter DCs und NK-Zellen, Einfluss auf die Apoptose nicht-infizierter und infizierter Epithelzellen nehmen. Dafür wurden Epithelzellen mit Überständen nicht-infizierter und infizierter (72 hpi) DCs sowie Überständen infizierter DCs, die mit NK-Zellen co-kultiviert wurden, inkubiert (Abb. 4-32 A). Anschließend wurde die Apoptoseinduktion in den Epithelzellen zum einen durchflusszytometrisch durch die Messung Annexin-V-positiver Zellen (Abb. 4-32 B), zum anderen mithilfe von Western-Blot-Analysen (Abb. 4-32 C) anhand der Spaltung von Caspase-3 untersucht.

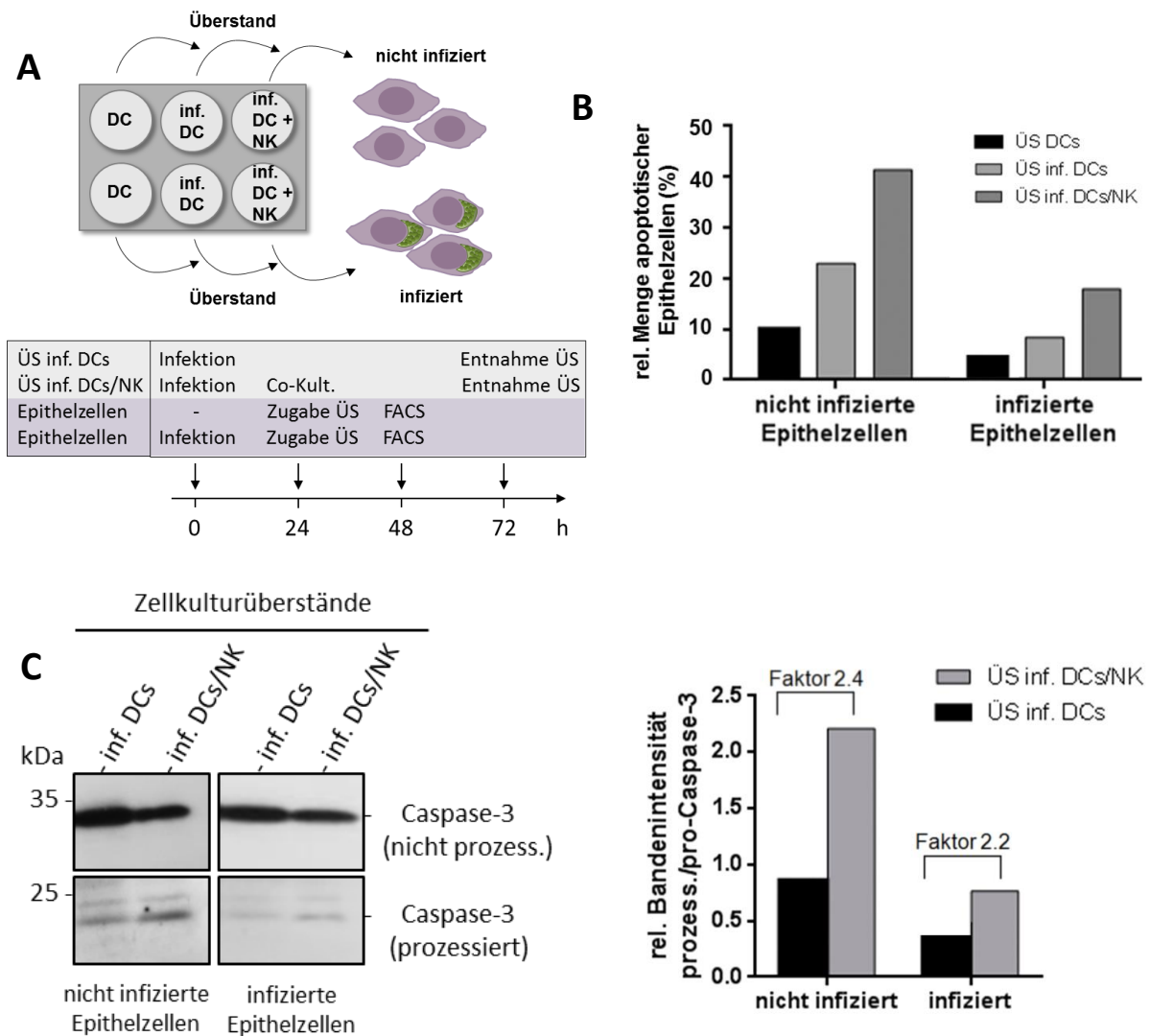


Abb. 4-32 Einfluss der erhöhten IFN- γ -Sekretion auf die Apoptose in Epithelzellen

(A) Zeitlicher Ablauf des Versuchsaufbaus. DCs (JAWSII) wurden nicht infiziert, für 72 h mit *C. psittaci* (MOI 10) infiziert oder für 24 h mit *C. psittaci* vorinfiziert und anschließend mit NK-Zellen (KY-2) für weitere 48 h co-kultiviert (Verhältnis DC:NK-Zellen = 2:1). Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen und auf nicht infizierte und vorinfizierte (24 hpi, MOI 20) Epithelzellen (MN-R) gegeben. 48 h später erfolgte die Anfärbung der Zellen für die durchflusszytometrische Analyse bzw. die Herstellung von Zelllysaten für die Western-Blot-Untersuchungen. (B) Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen nach 24 h Inkubation infizierter und nicht-infizierter Zellen mit den verschiedenen DC-Überständen mittels Annexin-V-FITC-Kit. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten. (C) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Caspase-3-Spaltung nach Behandlung von infizierten und nicht-infizierten Epithelzellen mit den verschiedenen DC-Überständen (links). Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten für pro-Caspase-3 und prozessierte Caspase-3 bestimmt. Dargestellt ist das Verhältnis der Bandenintensität von prozessierter/pro-Caspase-3. Die ermittelten Werte für Zellen die mit Überständen nicht-infizierter DCs inkubiert wurden, wurden auf 1 gesetzt (rechts).

Wie in Abb. 4-32 B zu sehen, führte die Behandlung nicht-infizierter Epithelzellen mit Überständen infizierter DCs zu einer leichten Apoptoseinduktion (Faktor 1,5) im Vergleich zu Epithelzellen, die mit Überständen nicht-infizierter DCs behandelt wurden. Die Überstände infizierter DCs, die mit NK-

Zellen co-kultiviert wurden, hatten eine stark erhöhte Apoptoserate (Faktor 4) in nicht-infizierten Epithelzellen zur Folge. Für infizierte Epithelzellen war die gemessene Grundapoptose erwartungsgemäß reduziert (Byrne and Ojcius 2004). Hier konnte jedoch durch die Inkubation mit dem Überstand infizierter DCs ebenfalls eine messbare Induktion um den Faktor 2 beobachtet werden; die zusätzliche Co-Kultivierung mit NK-Zellen hatte zudem ebenfalls einen sichtbaren Einfluss auf die Apoptose der infizierten Epithelzellen. Durch die Untersuchung der Caspase-3-Spaltung im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass die Behandlung nicht-infizierter Epithelzellen mit Überständen infizierter, mit NK-Zellen co-kultivierter DCs, zu einer erhöhten Spaltung (Faktor 2,4) führt, im Vergleich zur Behandlung mit Überständen infizierter DCs. Obschon in infizierten Epithelzellen eine deutlich reduzierte Caspase-3-Spaltung vorlag, zeigte sich auch hier ein detektierbarer positiver Effekt auf die Caspase-Prozessierung in Anwesenheit von Überständen infizierter, mit NK-Zellen co-kultivierter DCs (Abb. 4-32 C). So wurde eine Zunahme der Spaltung um den Faktor 2,2 im Vergleich zum Überstand infizierter DCs gemessen. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass das TNF- α infizierter DCs in Kombination mit dem durch iDexosomen induzierten IFN- γ co-kultivierter NK-Zellen, zu einer erhöhten Apoptoseinduktion nicht-infizierter, aber auch Chlamydien-infizierter Epithelzellen führt. Dies deutet darauf hin, dass die chlamydiale Subversion der Apoptose infizierter Zellen zu einem gewissen Teil durch eine kombinatorische Wirkung von IFN- γ und TNF- α „ausgehebelt“ werden kann.

4.3 Anti-chlamydiale Abwehr von NK-Zellen

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass DCs einen Abwehrmechanismus besitzen, durch welchen sie die chlamydialen Inklusionen zunächst desintegrieren, die Pathogene im Folgenden dem Auto-/Xenophagieweg zuführen und die generierten Antigene letztendlich mithilfe von MHCI-Molekülen CD8⁺ T-Zellen präsentieren (Radomski, Kagebein, et al. 2017), (Radomski, Rebbig, et al. 2017). Des Weiteren scheinen auch die, eng mit dem Autophagieweg verzahnten, von infizierten DCs massiv freigesetzten, Exosomen eine bedeutende Rolle in der anti-chlamydialen Abwehr zu spielen. Durch nachgeschaltete Mechanismen induzieren sie Apoptose in nicht-infizierten, und zum Teil auch in infizierten, Epithelzellen und wirken somit vermutlich einer Infektionsausbreitung entgegen. An diesem Vorgang sind NK-Zellen maßgeblich beteiligt, die, induziert durch Exosomen, in starkem Maße IFN- γ sezernieren und damit den durch TNF- α vermittelten apoptotischen Effekt der DCs auf Epithelzellen deutlich erhöhen (Abb. 4-32). Aufgrund dieser Beobachtung sowie der bereits gezeigten Beteiligung von NK-Zellen in der frühen Immunabwehr einer Chlamydieninfektion (Tseng and Rank 1998), kam letztlich die Frage auf, ob NK-Zellen ebenfalls mit Chlamydien infizierbar sind und ob sie, ähnlich wie APCs, Mechanismen entwickelt haben, um eine Chlamydieninfektion zu bekämpfen. Gegenstand des folgenden Kapitels war es daher, die Rolle von NK-Zellen in der anti-chlamydialen Abwehr näher zu untersuchen.

4.3.1 Infektion von NK-Zellen mit *C. psittaci*

Um zu klären, ob und in welchem Maße auch NK-Zellen mit Chlamydien infizierbar sind, wurden KY-2-Zellen mit Chlamydien infiziert (MOI 40) und die Infektion über einen Zeitraum von 72 h im Western-Blot (Abb. 4-33 A) anhand der Expression von chlamydialem Hsp60 verfolgt, sowie mithilfe von immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen (Abb. 4-33 B) betrachtet. Parallel wurden semi-quantitative PCR-Untersuchungen, zur Charakterisierung der Expression verschiedener chlamydialer Replikationsfaktoren, in NK-Zellen durchgeführt.

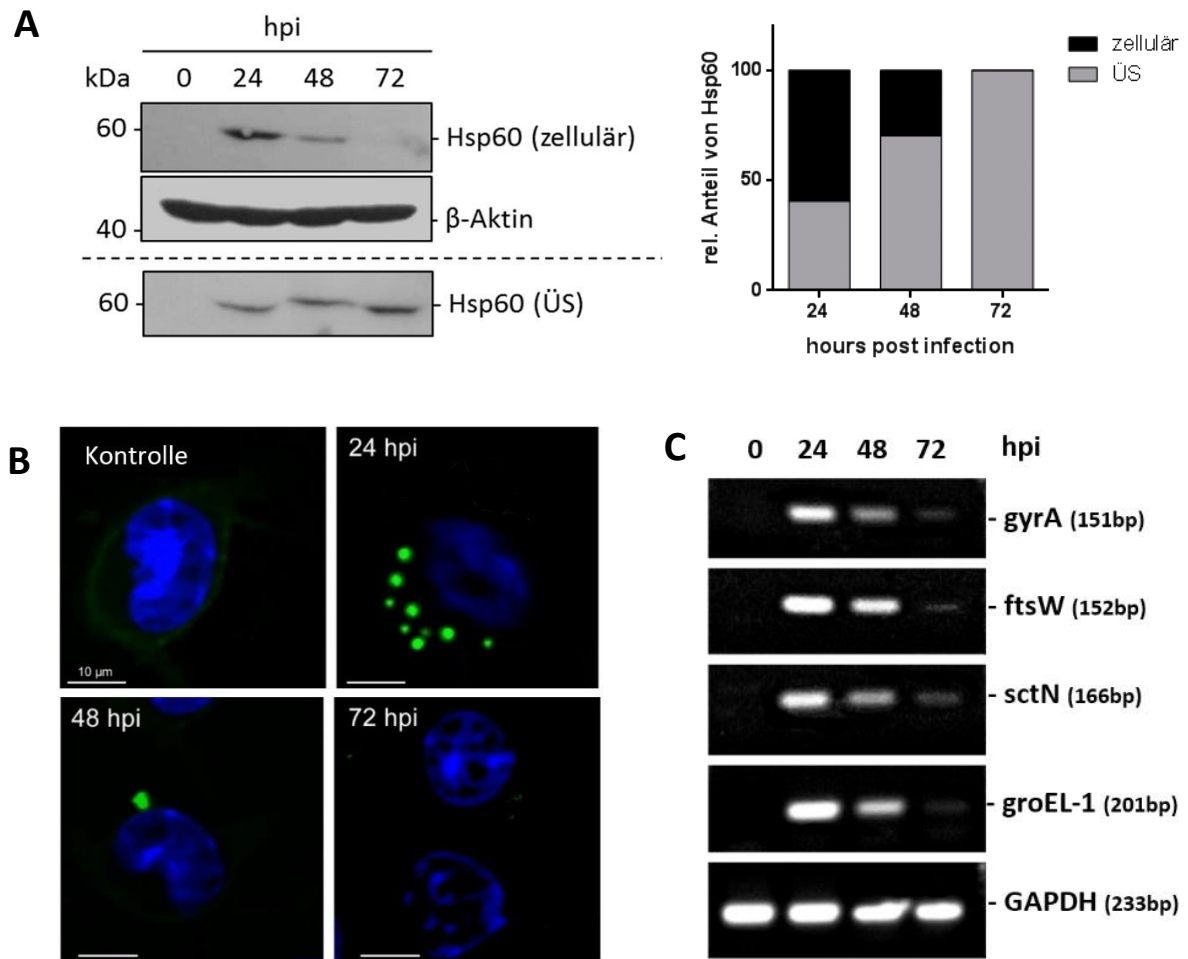


Abb. 4-33 Infektion von NK-Zellen

(A) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Infektion *C. psittaci*-infizierter KY-2-Zellen (MOI 40) anhand von chlamydialem Hsp60 in Zellen (zellulär) sowie im Zellkulturüberstand (ÜS). Um alle nicht aufgenommenen Chlamydien aus dem Zellkulturüberstand zu entfernen, wurden die Zellen 3 hpi drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend in neuem Zellkulturmedium aufgenommen. Zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten wurden die Zellen, wie unter 3.4.1 beschrieben, lysiert. Die Zellkulturüberstände wurden für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert und das Pellet direkt in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. β -Aktin diente als Ladekontrolle (links). Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten für chlamydiales Hsp60 (zellulär und ÜS) bestimmt. Dargestellt ist der relative Anteil von chlamydialem Hsp60 in Zellen sowie im Überstand in % (rechts). (B) Immunfluoreszenz-Analyse zur Visualisierung der Infektion von NK-Zellen. KY-2-Zellen wurden mit *C. psittaci* infiziert (MOI 40) und für Chlamydien (grün) und DNA (DAPI, blau) angefärbt. Der weiße Balken entspricht jeweils 10 μ m. (C) Semi-quantitative PCR-Analyse chlamydialer Faktoren. Dargestellt ist die Expressionsrate der PCR-Amplifikate *gyrA* (DNA-Replikation), *ftsW* (Zellteilung), *sctN* (Typ-III-Sekretionssystem), *groEL-1* (Stressantwort) von *C. psittaci* in KY-2-Zellen (MOI 40). Murines GAPDH diente als Ladekontrolle.

Wie in Abb. 4-33 A ersichtlich, kam es 24 hpi zu einem deutlichen Anstieg von chlamydialem Hsp60 in der Zelllysatsfraktion, was zeigt, dass NK-Zellen ebenfalls mit Chlamydien infizierbar sind. Auffällig war jedoch, dass das Signal für chlamydiales Hsp60 im Infektionsverlauf von 24 zu 48 hpi stark abnahm und 72 hpi in Zelllysaten nicht mehr zu detektieren war. Diese Beobachtung wäre zum einen durch

die Degradation der Chlamydien von Seiten der NK-Zellen zu begründen, zum anderen wäre eine Freisetzung der Pathogene in den Zellkulturüberstand denkbar. Um dies zu untersuchen, wurden nachfolgend neben den Zelllysaten auch die Zellkulturüberstände analysiert, um die möglicherweise darin befindlichen Chlamydien, wiederum anhand von chlamydialem Hsp60, zu detektieren. Um auszuschließen, dass es sich dabei lediglich um nicht aufgenommenes chlamydiales Material handelt, wurden die Zellen 3 h nach der Infektion drei Mal mit PBS gewaschen und schließlich in neuem Zellkulturmedium aufgenommen. Wie im unteren Teil der Abb. 4-33 A sowie anhand der grafischen Quantifizierungsdarstellung (Abb. 4-33 A, rechts) zu sehen, war die Abnahme des Hsp60-Signals im Zelllysate tatsächlich von einer Zunahme des Signals im Zellkulturüberstand begleitet. Einhergehend damit, fiel bei der Untersuchung des Infektionsverlaufs mittels Immunfluoreszenzmikroskopie auf, dass sich zu keinem der untersuchten Infektionszeitpunkte eine chlamydiale Inklusion in NK-Zellen etablierte (Abb. 4-33 B). Stattdessen waren lediglich sehr kleine punktuelle Strukturen zu sehen, die vorwiegend in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert waren. Konform zu den Beobachtungen der Western-Blot-Analysen, waren 72 hpi keine chlamydialen Strukturen mehr innerhalb der Zellen nachweisbar. Durch semi-quantitative PCR-Analysen konnte die Reduktion von Hsp60, dem Indikator für chlamydiale Proteinbiosynthese, im Infektionsverlauf von NK-Zellen noch einmal auf der Transkriptionsebene (groEL-1) bestätigt werden (Abb. 4-33 C). Auch für alle weiteren untersuchten chlamydialen Faktoren wurde zwischen 24 und 72 hpi eine starke Reduktion der Transkription beobachtet. Weder für *gyrA*, das die DNA-Replikation der Chlamydien anzeigt, noch *ftsW* und *sctN*, welche für die Zellteilung bzw. das Typ-III-Sekretionssystem stehen, war eine, den normalen und/oder persistierenden Infektionszyklus begleitende erhöhte Transkription (Goellner et al. 2006), zu verzeichnen. Damit untermauern diese Ergebnisse zum einen die Vermutung der Chlamydienfreisetzung durch NK-Zellen, zum anderen zeigen die Daten, wie bereits anhand der Immunfluoreszenz-Analysen vermutet, dass es zu keinem Infektionszeitpunkt zu einer erfolgreichen Etablierung der Chlamydien und folglich zu keiner zyklusvermittelten EB-RB-Differenzierung kommt. Das wiederum lässt auf eine Freisetzung von EBs schließen, die möglicherweise noch in der Lage sind Epithelzellen zu infizieren.

Bevor weitere Analysen folgten, wurde zunächst anhand eines weiteren Experiments untersucht, ob es sich bei dem beobachteten Mechanismus der Chlamydienfreisetzung um ein KY-2-Zelllinienspezifisches Phänomen handelt. Dafür wurden primäre NK-Zellen mithilfe des Maus NK-Zell-Isolations Kits (Miltenyi) aus den Milzen von C57BL/6-Mäusen isoliert und anschließend zunächst hinsichtlich ihrer Reinheit untersucht. Nachdem gezeigt werden konnte, dass 96 % der isolierten Zellen positiv für den NK-Zellmarker NK1.1 waren (s. Kapitel 3.3.2), wurden die Zellen für Western-Blot-Analysen zur Untersuchung der Chlamydienfreisetzung (Abb. 4-34) sowie für ein weiteres Schlüsselexperiment (Kapitel 4.3.4) in der Immunfluoreszenz eingesetzt.

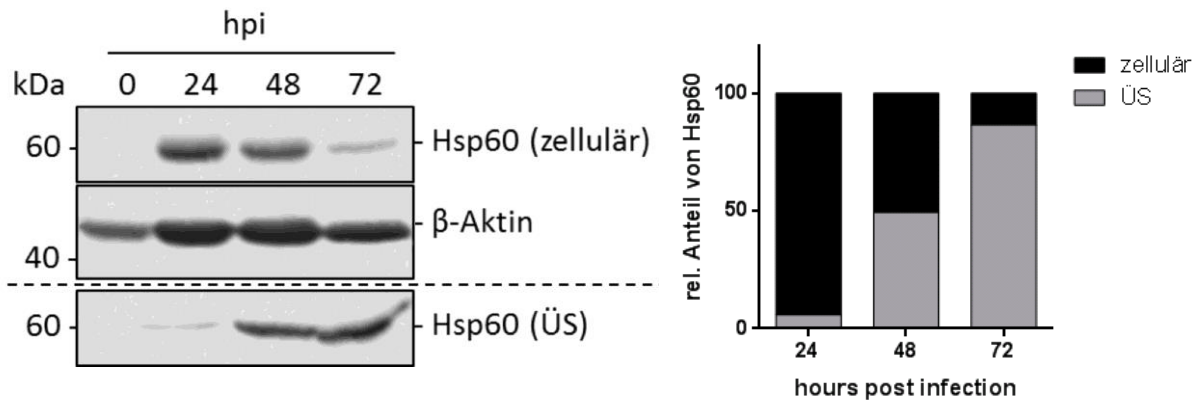


Abb. 4-34 Infektion von primären NK-Zellen

Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Infektion *C. psittaci*-infizierter (MOI 40) primärer NK-Zellen (C57BL/6) anhand von chlamydialem Hsp60 in Zellen (zellulär) sowie im Zellkulturüberstand (ÜS). Um alle nicht aufgenommenen Chlamydien aus dem Zellkulturüberstand zu entfernen, wurden die Zellen 3 hpi drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend in neuem Zellkulturmedium aufgenommen. Zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten wurden die Zellen, wie unter 3.4.1 beschrieben, lysiert. Die Zellkulturüberstände wurden für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert und das Pellet direkt in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. β -Aktin diente als Ladekontrolle (links). Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten für chlamydiales Hsp60 (zellulär und ÜS) bestimmt. Dargestellt ist der relative Anteil von chlamydialem Hsp60 in Zellen sowie im Überstand in % (rechts).

Wie in Abb. 4-34 deutlich zu erkennen, kam es im Infektionsverlauf primärer NK-Zellen ebenfalls zu einer massiven Abnahme des Signals für chlamydiales Hsp60 in der Zelllysatsfraktion. Zeitgleich zeigte sich, wie bereits für die Infektion von KY-2-Zellen, eine Anreicherung von chlamydialem Hsp60 im Zellkulturüberstand. Damit konnte die Freisetzung von Chlamydien während des Infektionsverlaufs auch für primäre NK-Zellen nachgewiesen werden. Da es sich bei dem beobachteten Mechanismus demnach nicht um ein Zelllinien-spezifisches Phänomen zu handeln schien, wurden aufgrund experimenteller Praktikabilität und Handhabbarkeit alle weiteren Untersuchungen mit KY-2-Zellen durchgeführt.

4.3.2 Aktivierung von NK-Zellen während der Infektion

Für virale Infektionen konnte bereits mehrfach belegt werden, dass eine Aktivierung von NK-Zellen ohne Beteiligung co-stimulatorischer Signale möglich ist. Ein prominentes Beispiel dafür ist die CD16-abhängige Internalisierung humaner Papillomaviren, welche zu einer erhöhten zytotoxischen Aktivität und Zytokin-Produktion von NK-Zellen führt (Renoux et al. 2011). Die direkte Aktivierung von NK-Zellen durch bakterielle Erreger wird bisher allerdings kontrovers diskutiert (Marcenaro et al. 2008, Evans et al. 2011). Nachdem gezeigt werden konnte, dass NK-Zellen mit Chlamydien infizierbar

sind und die Pathogene, noch bevor sie sich in der Zelle etablieren können, wieder freigesetzt werden, stellte sich daher die Frage, ob die Chlamydieninfektion alleine für eine Aktivierung von NK-Zellen ausreicht. Um dies zu untersuchen, wurden NK-Zellen mit Chlamydien infiziert und 48 hpi die Expression von Perforin, sowie IFN- γ mittels Durchflusszytometrie gemessen. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der IFN- γ -Sekretion im Zellkulturüberstand über einen Infektionszeitraum von 72 h mittels *Mouse IFN- γ Platinum ELISA* (eBiosciences). Des Weiteren wurde das Transkriptionslevel von CD146, einem prominenten NK-Zell-Reifungsmarker (Despoix et al. 2008), während der Infektion mittels semi-quantitativer PCR verfolgt (Abb. 4-35).

4-35

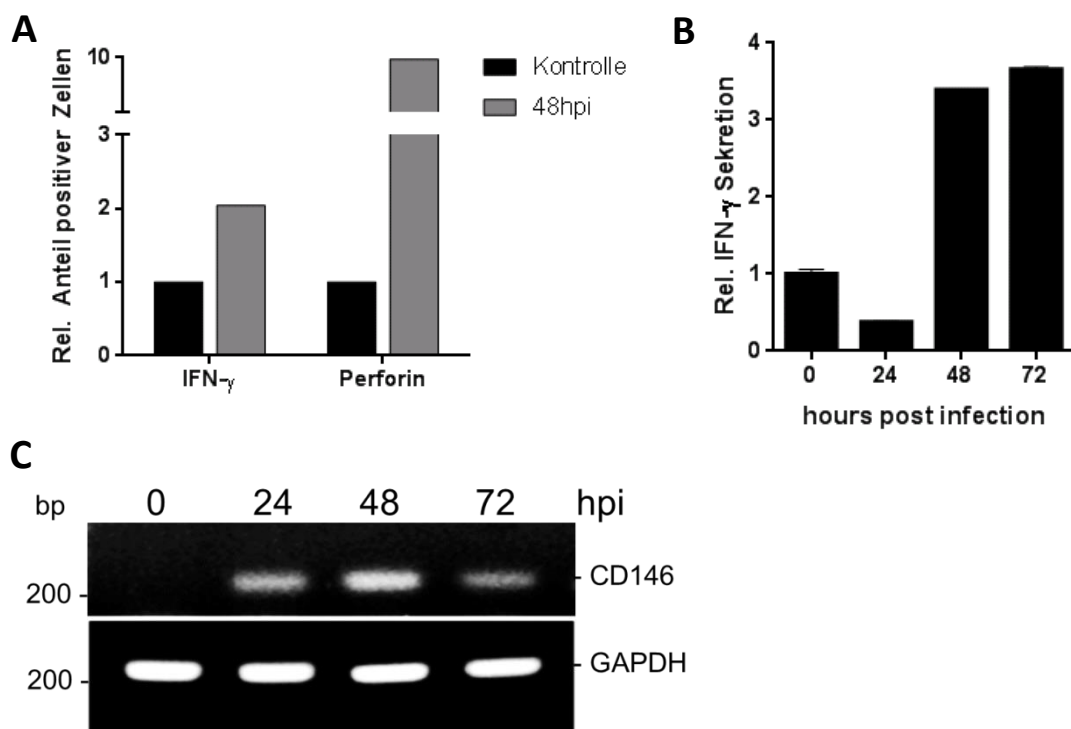


Abb. 4-35 Aktivierung von NK-Zellen während der Infektion

(A) Durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ - und Perforin-Expression *C. psittaci*-infizierter KY-2-Zellen (MOI 40, 48 hpi) im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen. Dargestellt ist der relative Anteil IFN- γ - und Perforin-positiver Zellen, wobei jeweils die nicht infizierte Kontrolle auf 1 gesetzt wurde. (B) Untersuchung der IFN- γ -Sekretion während der Infektion von NK-Zellen mittels ELISA (eBiosciences). Dargestellt ist die relative IFN- γ -Sekretion *C. psittaci*-infizierter KY-2-Zellen als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der gemessene Maximalwert bei 72 hpi wurde auf den relativen Wert von 3 gesetzt. (C) Semi-quantitative PCR-Analyse der CD146-Transkriptmenge nicht-infizierter und *C. psittaci*-infizierter (24-72 hpi) KY-2-Zellen. Murines GAPDH diente als Ladekontrolle.

Wie in Abb. 4-35 ersichtlich, kam es im Infektionsverlauf von 48 h zu einer deutlich erhöhten Anzahl IFN- γ - (Faktor 2) sowie insbesondere Perforin-positiver Zellen (Faktor 10) im Vergleich zu nicht-

infizierten Kontrollzellen. Mittels ELISA konnte zudem gezeigt werden, dass die erhöhte Anzahl IFN- γ -positiver Zellen (Abb. 4-35 B), mit einer ab 48 hpi deutlich erhöhten IFN- γ Sekretion einhergeht (Faktor 3,7). Durch semi-quantitative PCR-Analyse konnte außerdem eine Infektions-abhängige Induktion der CD146-Transkription nachgewiesen werden (Abb. 4-35 C). Zusammen deuten die Daten darauf hin, dass durch die Chlamydieninfektion eine direkte Aktivierung von NK-Zellen möglich ist. Damit scheinen NK-Zellen auch nach ihrer Infektion in der Lage zu sein, aktiv an einer anti-chlamydialen Immunantwort teilzunehmen.

4.3.3 Freisetzung von Chlamydien durch Degranulierung

Wie in Kapitel 4.3.1 bereits gezeigt, sind NK-Zellen offensichtlich in der Lage, eine Chlamydieninfektion zu klären. Da es im Infektionsverlauf von NK-Zellen zu einer Akkumulation chlamydialer Proteine im Zellkulturüberstand kam, konnte eine Degradation der Pathogene mittels Autophagie, wie sie für DCs beobachtet werden konnte (Radomski, Kagebein, et al. 2017), (Radomski, Rebbig, et al. 2017), bereits ausgeschlossen werden. Möglich wäre jedoch, dass Chlamydien von NK-Zellen mittels aktiver Exozytose ausgeschleust werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden NK-Zellen mit Chlamydien infiziert und 3 h später mit Inhibitoren behandelt, die an unterschiedlichen Stellen den Exozytoseweg blockieren. 48 und 72 hpi wurde dann der Einfluss der Inhibitoren auf die Infektion im Western-Blot, anhand der Expression von chlamydialem Hsp60, im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle, untersucht (Abb. 4-36).

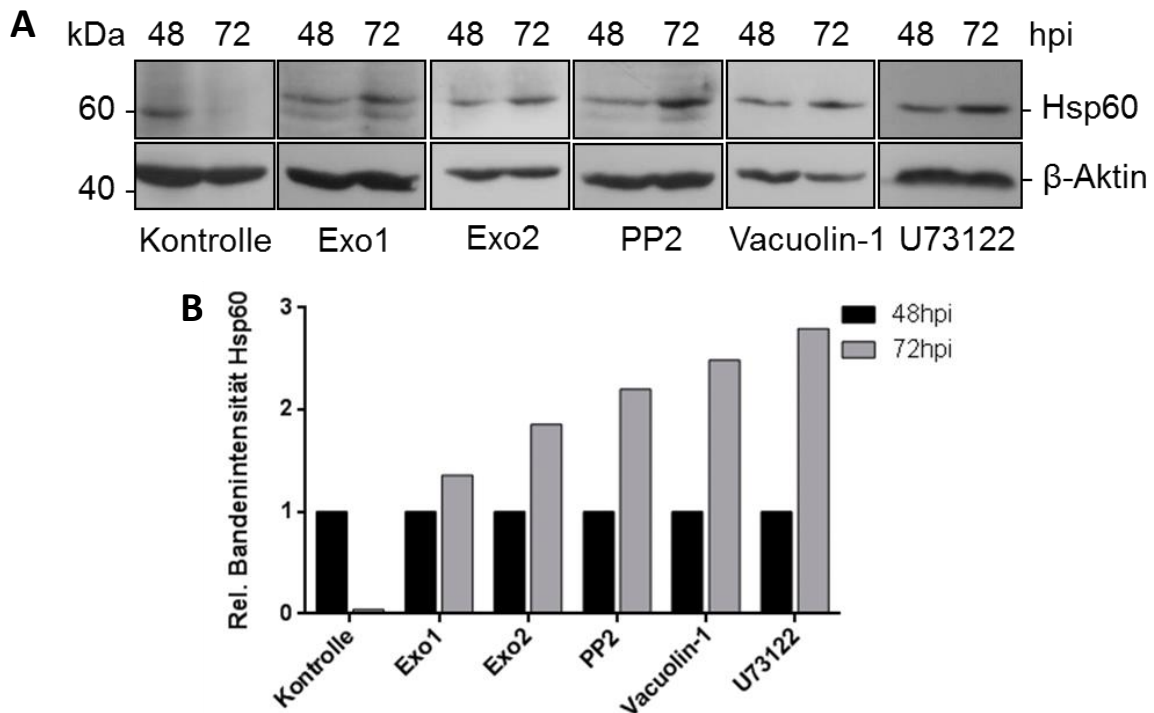


Abb. 4-36 Einfluss verschiedener Exozytoseinhibitoren auf die Infektion

(A) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression von chlamydialem Hsp60 in *C. psittaci*-infizierten (MOI 40) und mit Exozytoseinhibitoren-behandelten KY-2-Zellen. 3 hpi wurde Exo1 (50 μ M), Exo2 (50 μ M), PP2 (0,1 μ M), Vacuolin-1 (100 μ M) oder U73122 (10 μ M) zu den Zellen gegeben. β -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Durch densitometrische Analyse wurden die Bandenintensitäten von chlamydialem Hsp60 auf β -Aktin normiert. Die Bandenintensitäten infizierter Zellen (48 hpi) wurden jeweils auf 1 gesetzt.

Wie in vorherigen Experimenten bereits gezeigt, kam es im Infektionsverlauf von NK-Zellen zwischen 48 und 72 hpi zu einer massiven Reduktion des Hsp60-Signals (Abb. 4-36). Diese Art der Reduktion hingegen war durch die Inkubation der Zellen mit allen der eingesetzten Exozytoseinhibitoren nicht zu beobachten. Die Inkubation der Zellen mit allen der eingesetzten Exozytoseinhibitoren, die beide den vesikulären Transport zwischen ER und Golgi-Apparat blockieren, indem sie die Arf1-abhängige Rekrutierung von Hüllproteinen zu Vesikeln inhibieren, hatte eine 1,4- bzw. 1,9-fache Erhöhung des Hsp60-Signals zur Folge (Abb. 4-36). Vacuolin-1, das die Fusion von endo-lysosomalen Kompartimenten mit der Plasmamembran inhibiert, führte ebenfalls zu einer 2,5-fach gesteigerten Infektion der Zellen, ebenso wie PP2 und U73122, die beide die Degranulierung inhibieren (Faktor 2,2 bzw. 2,8) (Abb. 4-36). Somit führten alle verwendeten Inhibitoren, die auf unterschiedliche Weise in den Exozytoseweg eingreifen, zu einer moderat bis stark erhöhten Infektion von NK-Zellen. Folglich sprechen die Daten für eine aktive Freisetzung von Chlamydien mittels exozytotischer Mechanismen.

NK-Zellen als sekretorische Zellen sind sowohl zur konstitutiven, als auch zur regulierten Exozytose von Molekülen befähigt (Lacy and Stow 2011). Demnach kämen zwei Wege für die Freisetzung von

Chlamydien in Betracht. Für COPI-umhüllte Vesikel konnte neben einer Reihe anderer Funktionen, wie beispielsweise der Entstehung und Sortierung von Vesikeln des Golgi-Apparats und deren Transport zum Endoplasmatischen Retikulum (Popoff et al. 2011) oder der Sortierung vakuolarer Proteine in MVBs (Gabriely, Kama, and Gerst 2007), eine Rolle in der regulierten Sekretion zugeschrieben werden (Beron et al. 2001). Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob NK-Zellen Chlamydien durch regulierte Sekretion freisetzen, wurden daher immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, unter Verwendung eines anti-COPI-Antikörpers, durchgeführt (Abb. 4-37).

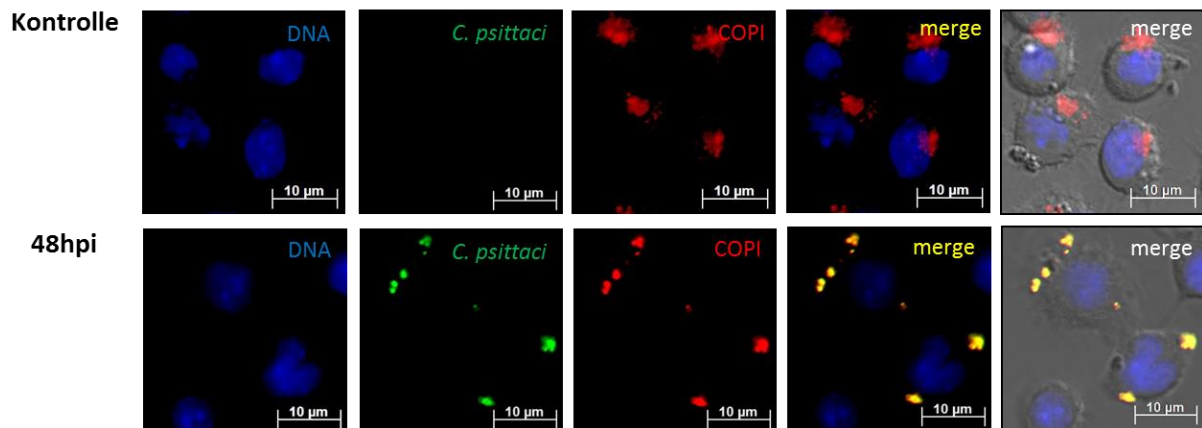


Abb. 4-37 Assoziation chlamydialer Strukturen mit COPI-Vesikeln

Immunfluoreszenz-Analyse der Co-Lokalisation von COPI (rot) mit Chlamydien (grün). DNA wurde mittels DAPI blau angefärbt. KY-2-Zellen blieben nicht infiziert oder wurden für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 40) infiziert.

Wie in Abb. 4-37 zu sehen, waren COPI-Vesikel in nicht-infizierten Kontrollzellen in naher Lokalisation zum Zellkern zu beobachten und vermutlich mit dem Golgi-Apparat assoziiert. In infizierten NK-Zellen hingegen waren COPI-Vesikel ausschließlich mit chlamydialen Strukturen assoziiert und hatten ihre Zellkern-/Golgi-nahe Lokalisation vollständig verloren. Mit dieser Beobachtung war ein erster Hinweis für eine Freisetzung von Chlamydien mittels regulierter Exozytose gegeben. Die klassische Degranulierung von NK-Zellen ist ebenfalls ein Prozess der regulierten Sekretion. Sekretorische Granula, die hauptsächlich Granzyme und Perforin beinhalten, befinden sich in einer Größenordnung von 0,2-1 µm (Rak et al. 2011). Damit wäre theoretisch die Aufnahme von EBs (\emptyset 0,2-0,3 µm) und sogar RBs (\emptyset 0,5-1 µm) in diese Vesikel und die anschließende Freisetzung mittels Degranulierung möglich. Um zu untersuchen, ob Chlamydien in NK-Zellen in sekretorische Granula aufgenommen und mittels Degranulierung sekretiert werden, wurden NK-Zellen mit Chlamydien infiziert und anschließend zunächst eine mögliche Assoziation von chlamydialen Strukturen mit Perforin in der Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 4-38, Abb. 4-39). Parallel dazu wurde mithilfe von ELISA-Tests die Granzym-B-Sekretion während der Infektion von NK-Zellen, als Maß für die Degranulierung,

analysiert (Abb. 4-40). Abschließend schlossen sich außerdem TEM-Analysen an, um die Lokalisation von Chlamydien in NK-Zellen und deren Freisetzung abschließend zu klären (Abb. 4-41).

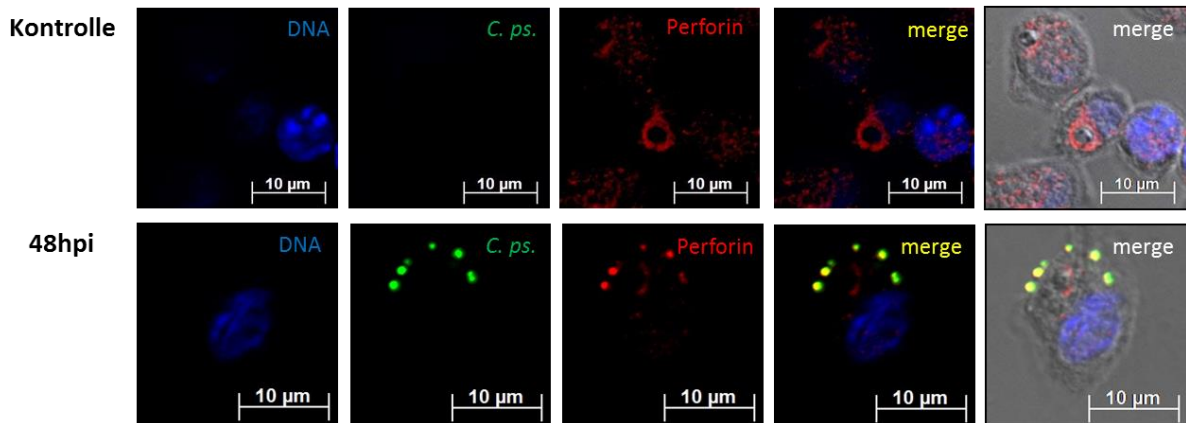


Abb. 4-38 Assoziation von chlamydialen Strukturen mit Perforin

Immunfluoreszenz-Analyse der Co-Lokalisation von Perforin (rot) mit Chlamydien (grün). DNA wurde mittels DAPI blau angefärbt. KY-2-Zellen wurden für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 40) infiziert.

Wie in Abb. 4-38 zu sehen, waren Perforin-haltige Granula in nicht-infizierten Kontrollzellen als kreisförmige Strukturen in der Nähe des Zellkerns zu beobachten. In infizierten Zellen (48 hpi) hingegen hatte Perforin seine Zellkern-nahe Lokalisation vollständig verloren und es konnte eine starke Co-Lokalisation von chlamydialen Strukturen mit Perforin beobachtet werden. Auch im Infektionsverlauf primärer NK-Zellen kam es bis 48 hpi zu einer starken Co-Lokalisation von Chlamydien mit Perforin-haltigen Granula (Abb. 4-39). Zudem waren die ebenfalls sehr kleinen chlamydialen Strukturen auch hier lediglich in einer nahen Lokalisation zur Plasmamembran zu finden, was davon ausgehen lässt, dass es auch hier zu keiner Etablierung einer parasitophoren Vakuole kommt und die Chlamydien stark in ihrer Entwicklung gestört sind. 72 hpi waren auch in primären NK-Zellen keine chlamydialen Strukturen mehr innerhalb der Zellen nachweisbar. Damit konnte der für KY-2-Zellen beobachtete Phänotyp der Infektion (s. Vergleich Abb. 4-33 B) sowie die Assoziation von Chlamydien mit Perforin-haltigen Granula auch für Primärzellen bestätigt werden.

Ergebnisse

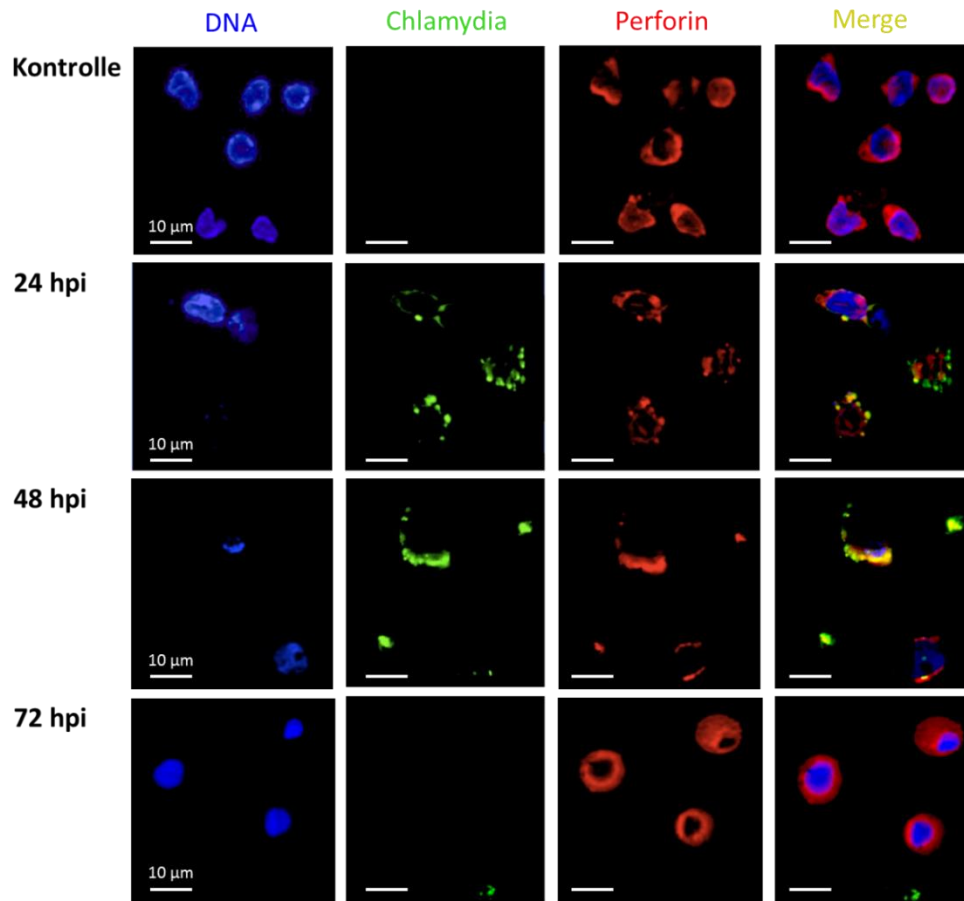


Abb. 4-39 Assoziation von chlamydialen Strukturen mit Perforin in primären NK-Zellen

Immunfluoreszenz-Analyse der Co-Lokalisation von Perforin (rot) mit Chlamydien (grün); DAPI (blau). Primäre NK-Zellen (C57BL/6) wurden für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 40) infiziert.

Nachdem durch die Co-Lokalisation Perforin-haltiger Granula mit chlamydialen Strukturen erste Hinweise für eine Freisetzung der Pathogene mittels Degranulierung vorlagen, wurde zunächst untersucht, ob es im Rahmen der Chlamydieninfektion tatsächlich zu einer Sekretion von Granula kommt. Dafür wurden NK-Zellen mit Chlamydien infiziert und die Granzym-B-Sekretion im Zellkulturüberstand zu verschiedenen Infektionszeitpunkten mittels *Mouse Granzyme B Platinum ELISA* (eBiosciences) bestimmt. Parallel dazu erfolgte die Messung der Granzym-B-Sekretion von NK-Zellen, die mit TNF- α -, LPS- bzw. Exosomen infizierter DCs behandelten wurden.

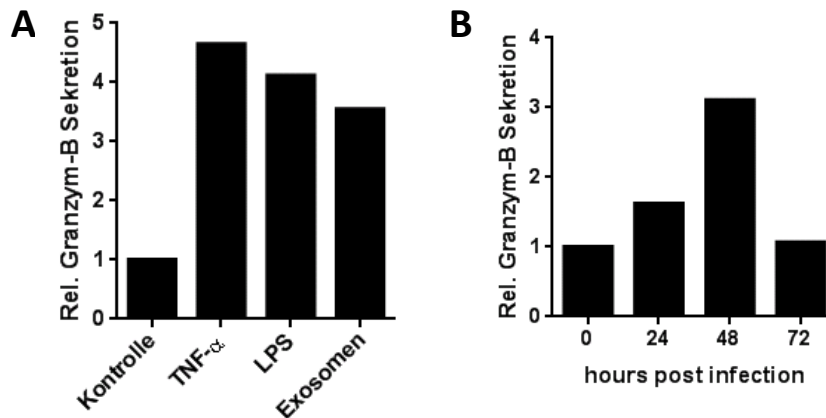
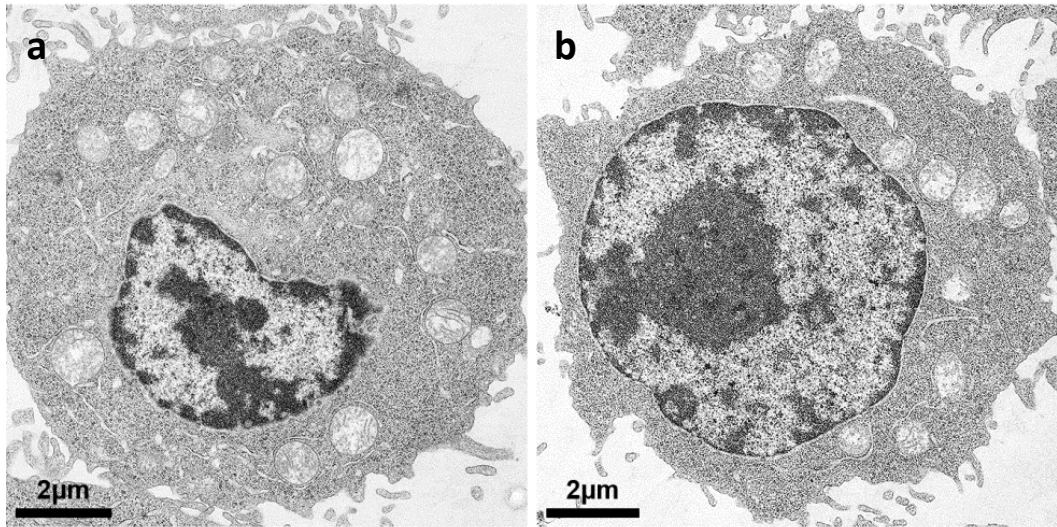


Abb. 4-40 Granzym-B-Sekretion infolge der Stimulation bzw. Infektion

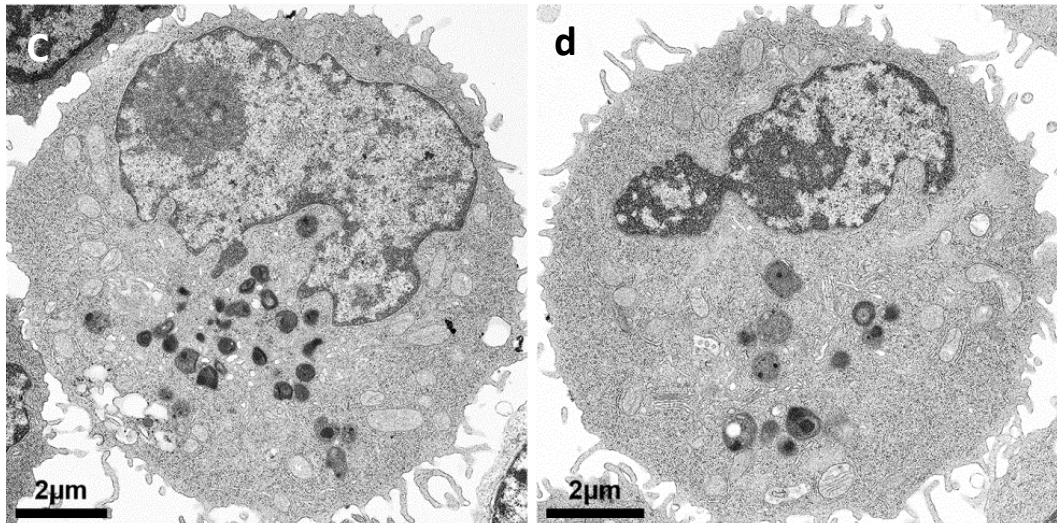
Dargestellt ist die relative Granzym-B Sekretion TNF- α - (30 ng/ml), LPS- (10 ng/ μ l) oder Exosomen- (Donor:Akzeptorzellzahl 1:1)-behandelter (48 h) bzw. *C. psittaci*-infizierter KY-2-Zellen (MOI 40, 48 hpi) mittels ELISA. Die nicht behandelte/nicht infizierte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

Wie in Abb. 4-40 A ersichtlich, führte sowohl die 48 h Behandlung mit TNF- α , LPS als auch Exosomen infizierter DCs zu einer starken Induktion der Granzym-B-Sekretion (Faktor 4,5, 4 bzw. 3,5) und damit der Degranulierung von NK-Zellen. Auch im Infektionsverlauf von NK-Zellen kam es zu einer deutlich erhöhten Granzym-B-Sekretion (Faktor 3) im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen. Die erhöhte Granzym-B-Sekretion von NK-Zellen während der Chlamydieninfektion untermauert somit die anhand der Immunfluoreszenz-Analysen getroffene Hypothese einer Freisetzung der Chlamydien mittels Degranulierung. Um die intrazelluläre Lokalisation der Chlamydien in NK-Zellen sowie die Frage der Freisetzung endgültig zu klären, wurden NK-Zellen mit Chlamydien infiziert und zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten (48 und 72 hpi) für die Elektronenmikroskopie vorbereitet.

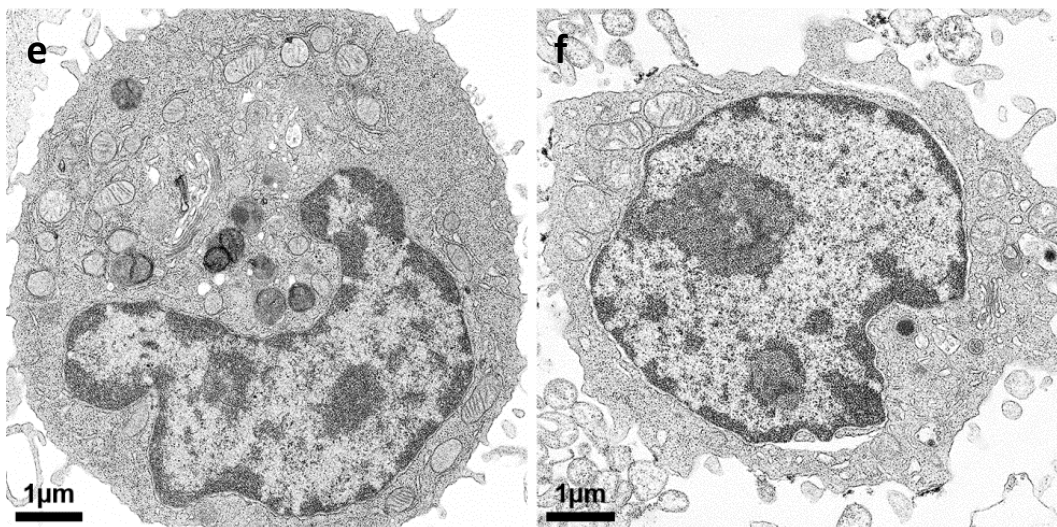
A Kontrolle



48hpi



72hpi



B Kontrolle

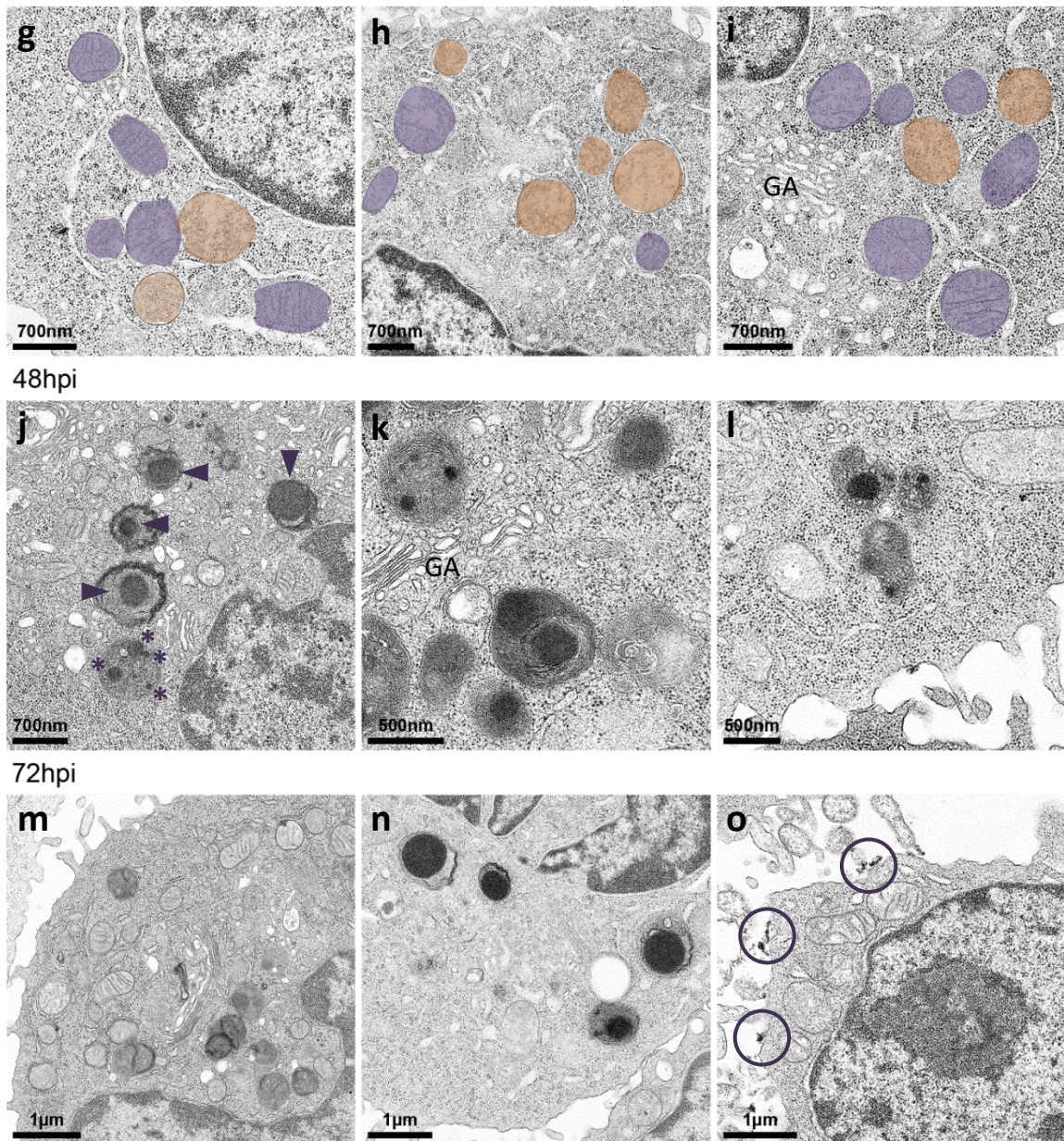


Abb. 4-41 TEM-Aufnahmen Chlamydien-infizierter NK-Zellen

(A) TEM-Analyse nicht-infizierter (a, b) und *C. psittaci*-infizierter (MOI 40) KY-2-Zellen 48 hpi (c, d) bzw. 72 hpi (e, f). (B) Vergrößerte Bildausschnitte nicht-infizierter (g, h, i) und *C. psittaci*-infizierter (MOI 40) KY-2-Zellen 48 hpi (j, k, l) bzw. 72 hpi (m, n, o). Sekretorische Granula sind artifiziell braun und Mitochondrien blau eingefärbt, GA: Golgi-Apparat. Pfeile markieren Chlamydien innerhalb sekretorischer Granula, Sterne kennzeichnen ggf. bereits zersetzte chlamydiale Strukturen, Kreise kennzeichnen an der Zelloberfläche bzw. extrazellulär befindliche chlamydiale Strukturen.

Wie in Abb. 4-41 A (a, b) sowie in den vergrößerten Bildausschnitten in Abb. 4-41 B (g, h, i) deutlich zu sehen, waren in nicht-infizierten NK-Zellen sekretorische Granula als helle, kreisförmige Gebilde (braun hinterlegt) zu erkennen. Diese waren klar von Mitochondrien (blau hinterlegt) durch fehlende Cristae, und luminale multivesikuläre Strukturen zu unterscheiden (Vergleich s. Abb. 4-41 B (g, h))

und waren meist in einer nahen Lokalisation zum Golgi-Apparat (Abb. 4-41 B (i)) zu finden. In infizierten Zellen (48 hpi) hingegen war der Großteil der sekretorischen Granula voll von elektronendichtem Material (Abb. 4-41 A (c, d)). Die vergrößerten Aufnahmen der Granula in Abb. 4-41 B (j, k, l) zeigen sehr deutlich, dass die Granula Chlamydien, erkennbar als besonders elektronendichte, kreisförmige Strukturen, enthielten (Pfeile). Die Chlamydien innerhalb der Granula hatten dabei Durchmesser von 200-400 nm, was der Größenordnung von EBs entspricht. Somit bestätigen die TEM-Analysen nochmals die Annahme, dass Chlamydien in NK-Zellen stark in ihrer Entwicklung beeinträchtigt sind und es nicht zur Differenzierung zu RBs kommt. Neben den für EBs beschriebenen Größenordnungen konnten innerhalb der Granula jedoch auch deutlich kleinere, besonders elektronendichte Strukturen (Sterne) beobachtet werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen 50-90 nm großen Gebilden um Chlamydien handelt, die zum Teil bereits durch die Aktivität der, innerhalb der Granula befindlichen, Enzyme zersetzt wurden. 72 hpi waren in einigen Zellen ebenfalls noch Chlamydien innerhalb sekretorischer Granula zu finden, die teilweise eine nahe Lokalisation zur Plasmamembran eingenommen hatten (Abb. 4-41 A (d), Abb. 4-41 B (m, n)). Bei dem Großteil der Zellen hingegen waren Reste chlamydialer Strukturen lediglich als elektronendichtes Material an der Zelloberfläche oder außerhalb der Zelle zu beobachten (Abb. 4-41 A (e), Abb. 4-41 B (o)) (Kreise). Zusammen mit den Beobachtungen der Assoziation von chlamydialen Strukturen mit Perforin-haltigen Granula sowie einer erhöhten Degranulierung im Infektionsverlauf konnte somit die Hypothese einer Chlamydien-Freisetzung von NK-Zellen mittels Degranulierung bestätigt werden.

Es stellte sich nun die wichtige Frage, durch welches Signal die Degranulierung ausgelöst bzw. welche Signalkaskade während der Infektion von NK-Zellen aktiviert wird. Für HAECs-Zellen wurde gezeigt, dass es während der Chlamydieninfektion zur Phosphoaktivierung von Phosphokinase C (PKC) kommt (Vielma et al. 2002). Von PKC- θ wiederum wird angenommen, dass sie eine zentrale Rolle in dem hoch komplexen und streng kontrollierten Prozess der Degranulierung von NK-Zellen spielt (Aguilo et al. 2009). Im Folgenden schlossen sich daher Western-Blot-Analysen an, um zu untersuchen, ob die Chlamydien-Freisetzung von NK-Zellen mittels Degranulierung ebenfalls durch die Phospho-Aktivierung von PKC- θ ausgelöst wird. Da die PKC-Aktivierung von NK-Zellen durch PMA und Ionomycin hervorgerufen werden kann (Aguilo et al. 2009), wurden als Positivkontrolle Zelllysate von PMA-/Ionomycin-behandelten NK-Zellen mitgeführt.

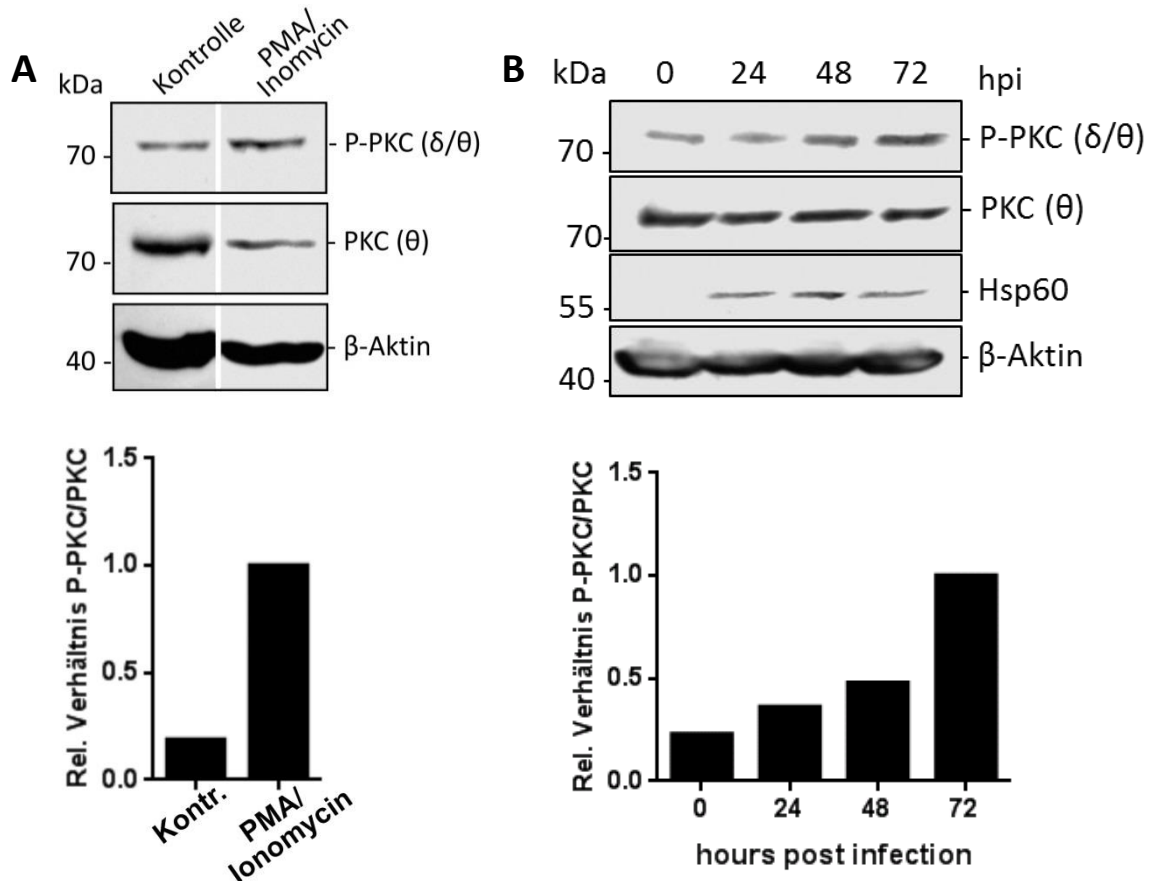


Abb. 4-42 PKC-Aktivierung nach Stimulation und während der Infektion

Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der PKC-Aktivierung nach PMA/Ionomycin-Behandlung (A) bzw. Chlamydieninfektion (B) in NK-Zellen (oben). (A) KY-2-Zellen wurden für 48 h mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (100 ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt. (B) KY-2-Zellen wurden für 24-72 h mit *C. psittaci* (MOI 40) infiziert oder blieben nicht infiziert. β -Aktin diente jeweils als Ladekontrolle. Nach densitometrischer Bestimmung der Bandenintensitäten wurde das relative Verhältnis von P-PKC/PCPK berechnet. Der Wert für PMA/Ionomycin-behandelte bzw. Chlamydien-infizierte (72 hpi) NK-Zellen wurde jeweils auf 1 gesetzt (unten).

Abb. 4-42 A zeigt, dass es, wie bereits beschrieben, in NK-Zellen durch die Behandlung von PMA und Ionomycin zur Phospho-Aktivierung von PKC- θ kommt. 48 h nach der Kombinationsbehandlung war das Verhältnis von P-PKC/PCPK, im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle, um das 5-fache gestiegen. Ähnliche Ergebnisse konnten im Rahmen der Chlamydieninfektion von NK-Zellen beobachtet werden (Abb. 4-42 B). Während die Bandenintensität für PKC im Infektionsverlauf nahezu konstant blieb, konnte bei der phosphorylierten und damit aktiven Form eine deutliche Zunahme des Signals über 72 h beobachtet werden (Faktor 4). Damit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es bei NK-Zellen, induziert durch die Chlamydieninfektion, zu einer Phospho-Aktivierung von PKC- θ kommt, die dann wiederum nachgeschaltete Signalkaskaden auslöst, die letztlich eine Degranulierung zur Folge haben (Anel et al. 2012).

4.3.4 Reinfektion von NK-Zellen und NK-Zellfunktion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen in der Lage sind, ihre Chlamydieninfektion durch Freisetzung der Pathogene im Rahmen der Degranulierung vollständig zu klären. Es stellte sich nun die Frage, ob sie auch in mehrfacher Weise zur Klärung der zellulären Infektion fähig sind und, ob die, wenn auch erfolgreiche Abwehr der Bakterien einen Einfluss auf die Killing-Aktivität von NK-Zellen nimmt. Um diese Punkte zu untersuchen, wurden NK-Zellen für 72 h mit Chlamydien infiziert und im Anschluss für weitere 72 h in Zellkulturmedium regeneriert. Diese Zellen wurden dann zum einen erneut für 24-72 h mit Chlamydien infiziert und die Infektion mittels chlamydialem HSP60 im Western-Blot (Abb. 4-43 A) verfolgt, zum anderen wurden sie direkt für *Killing-Assays* (Abb. 4-43 B) eingesetzt. Als *Targetzellen* für die *Killing-Assays* kamen die murinen T-Zell-Lymphomzelllinien RMA-S und YAC-1 zum Einsatz, wobei es sich bei RMA-S um TAP2-defiziente Zellen handelt und YAC-1-Zellen sich durch ihre reduzierte funktionale TAP-Aktivität und geringe MHCI-Expression auszeichnen. Nach 4-stündiger Co-Kultivierung von *Target*- und Effektorzellen erfolgte die Messung Propidiumiodid-positiver *Targetzellen* am Durchflusszytometer (Vizler et al. 2002). Als Negativkontrolle wurden *Targetzellen* mitgeführt, die unmittelbar vor der Probenmessung mit Effektorzellen in Kontakt kamen (Zellmix) (Abb. 4-43 B).

Ergebnisse

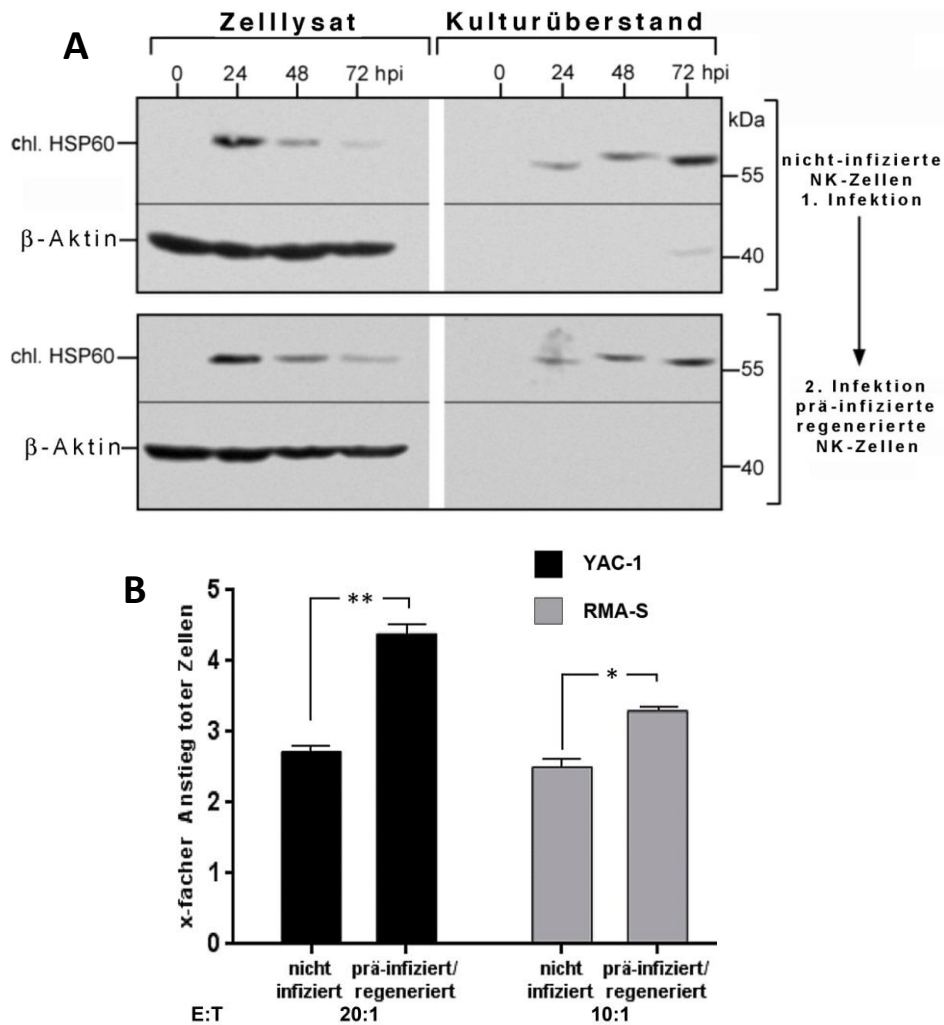


Abb. 4-43 Mehrfache Infektion und Killing-Fähigkeit von NK-Zellen

(A) Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Infektionsverlaufs infizierter und regenerierter NK-Zellen anhand von chlamydialem HSP60 im Zelllysat und Kulturüberstand. KY-2-Zellen wurden für 72 h mit *C. psittaci* (MOI 40) infiziert und für weitere 72 h in Zellkulturmedium regeneriert. Anschließend erfolgte die erneute Infektion der Zellen für 24-72 h mit *C. psittaci* (MOI 40). Um alle nicht aufgenommenen Chlamydien aus dem Zellkulturüberstand zu entfernen, wurden die Zellen 3 hpi drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend in neuem Zellkulturmedium aufgenommen. Zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten wurden die Zellen, wie unter 3.4.1 beschrieben, lysiert. Die Zellkulturüberstände wurden für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert und das Pellet direkt in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Zum Vergleich ist die Erstinfektion der Zellen mit abgebildet (oberer Teil). (B) Durchflusszytometrische Analyse der *Killing*-Fähigkeit von infizierten/regenerierten im Vergleich zu nicht-infizierten NK-Zellen. Infizierte und regenerierte KY-2-Zellen wurden für 4 h mit YAC-1- bzw. RMA-S-Zellen in einem Verhältnis von Effektor-:Target-Zellen von 20:1 bzw. 10:1 co-kultiviert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Targetzellen mit Propidiumiodid. Als Kontrollen dienten nicht infizierte und infizierte/regenerierte KY-2-Zellen, die unmittelbar vor der Anfärbung mit den entsprechenden Targetzellen gemischt wurden (Zellmix). Dargestellt ist der x-fache Anstieg toter Targetzellen nach Co-Kultivierung mit den entsprechenden Effektorzellen im Vergleich zum jeweiligen Zellmix. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Auswertungen \pm Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle (nicht-infiziert); $n = 3$).

Wie in Abb. 4-43 A (unterer Teil) zu sehen, führte die Infektion bereits infizierter/regenerierter NK-Zellen zu einer deutlichen Abnahme des Signals für chlamydiales HSP60 im Zelllysat, was von einer

Zunahme des Signals im Kulturüberstand begleitet war. Vergleicht man die Western-Blot-Analysen der Erst- und Zweitinfektion miteinander, zeigt sich, dass die Infektionsverläufe sowie die Freisetzung der Chlamydien aus den NK-Zellen nahezu identisch verlaufen (Abb. 4-43 A). Die *Killing*-Assays zeigten, dass bei der Co-Kultivierung nicht-infizierter NK-Zellen mit YAC-1- bzw. RMA-S-Zellen der Anteil toter *Targetzellen* um das ca. 2,5-fache erhöht war, im Vergleich zum entsprechenden Zellmix (Abb. 4-43 B). Für die Co-Kultivierung infizierter/regenerierter NK-Zellen mit RMA-S- bzw. YAC-1-Zellen konnte sogar eine erhöhte *Killing*-Aktivität beobachtet werden (3- bis 4-fach im Vergleich zum dazugehörigen Zellmix). Besonders deutlich war dies bei Verwendung von YAC-1-Zellen zu beobachten (Abb. 4-43 B). Somit kann gefolgert werden, dass NK-Zellen nach Erstinfektion und Regenerierung ihre Fähigkeit behalten, Chlamydien mittels Degranulierung freizusetzen, um ihre Infektion nachhaltig zu klären. Des Weiteren scheint sich die chlamydiale Infektion positiv auf die *Killing*-Aktivität der NK-Zellen auszuwirken.

4.3.5 Infektiosität von Chlamydien aus NK-Zellüberständen

Auf Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen ist davon auszugehen, dass Chlamydien, die von NK-Zellen aufgenommen wurden, stark in ihrem Entwicklungszyklus gestört sind. Es konnte kein Transport der Chlamydien zum MTOC und damit einhergehend keine Etablierung einer parasitophoren Vakuole beobachtet werden. Stattdessen zeichnete sich die Infektion dadurch aus, dass die chlamydialen Strukturen in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran verblieben. Basierend auf den reduzierten Transkriptmengen chlamydialer Replikationsfaktoren war außerdem davon auszugehen, dass es in NK-Zellen zu keiner EB-RB-Differenzierung kommt. Einhergehend damit zeigten die TEM-Analysen, dass meist einzelne, von der Größe her infektiösen EBs entsprechende, chlamydiale Strukturen in sekretorische Granula aufgenommen werden (Abb. 4-41). Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob die von NK-Zellen freigesetzten Chlamydien in der Lage sind, Epithelzellen, die Zielzellen von Chlamydien, zu infizieren. Um dies zu überprüfen, wurden BGM-Reporterzellen mit Zellkulturüberständen Chlamydien-infizierter NK-Zellen (48 hpi) inkubiert und 48 h später der Anteil infizierter Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

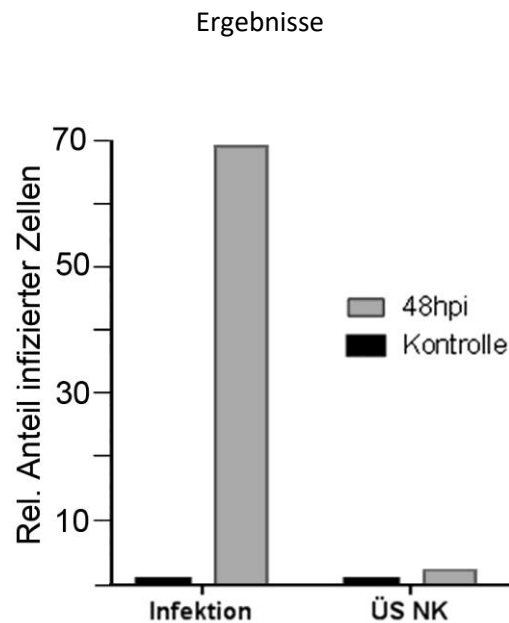


Abb. 4-44 Infektiosität von Chlamydien aus NK-Zellüberständen

Durchflusszytometrische Analyse der Infektion von BGM-Zellen nach Inkubation mit Zellkulturüberständen (ÜS) Chlamydien-infizierter NK-Zellen mittels IMAGEN-Kit. KY-2-Zellen wurden für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 40) infiziert oder blieben nicht infiziert. Anschließend erfolgte die 48 h Inkubation von BGM-Zellen mit den Zellkulturüberständen nicht-infizierter und infizierter NK-Zellen. Als Kontrolle wurden nicht infizierte, sowie *C. psittaci*-infizierte (MOI 30, 48 hpi) BGM-Zellen mitgeführt. Dargestellt ist der relative Anteil Chlamydien-positiver Zellen, wobei die Kontrolle jeweils auf 1 gesetzt wurde.

Wie in Abb. 4-44 zu sehen, führte die Inkubation von BGM-Zellen mit Zellkulturüberständen infizierter NK-Zellen zu einem kaum nachweisbaren Anteil Chlamydien-positiver Zellen ($\leq 3\%$). Durch die herkömmliche Infektion von BGM-Zellen mit einer MOI von 30 hingegen, konnte ein relativer Anteil infizierter Zellen von $> 60\%$ erzielt werden. Bedenkt man, dass die NK-Zellen, deren Überstand letztendlich für die Infektion von BGM-Zellen eingesetzt wurde, ursprünglich mit einer MOI von 40 infiziert wurden, ist die hierdurch verursachte Infektionsrate um mehr als 95 % reduziert und damit zu vernachlässigen. Folglich scheint nahezu die gesamte Population, der von NK-Zellen freigesetzten Chlamydien, nicht mehr infektiös zu sein.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten TEM-Analysen konnten bereits Strukturen ausfindig gemacht werden, die auf eine Degradation der Chlamydien innerhalb lytischer Granula hinwiesen (Abb. 4-41). Lytische Granula von NK-Zellen akkumulieren in ihrem Inneren insbesondere Perforin und Granzym (Topham and Hewitt 2009). Für Granzym-B konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym bei den drei nicht verwandten Bakterienspezies *E. coli*, *L. monocytogenes* und *M. tuberculosis* ein hoch konserviertes Set an Proteinen spaltet. Dieses Set beinhaltete vorwiegend Proteine, die eine bedeutende Rolle in der Biosynthese sowie metabolischen Wegen spielen, und somit von besonderer Bedeutung für das Überleben der Bakterien sind (Dotiwala et al. 2017). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob Granzym-B für den Verlust der Infektiosität der Chlamydien verantwortlich sein

könnte. Dafür wurden EBs für 4 h bei 37 °C mit rekombinantem Granzym-B inkubiert, mittels Zentrifugation pelletiert, gewaschen und schließlich in einer MOI von 30 für die Infektion von BGM-Zellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden parallel EBs für die Infektion verwendet, die ebenfalls für 4 h bei 37 °C inkubiert, nicht jedoch mit Granzym-B behandelt wurden (Abb. 4-45).

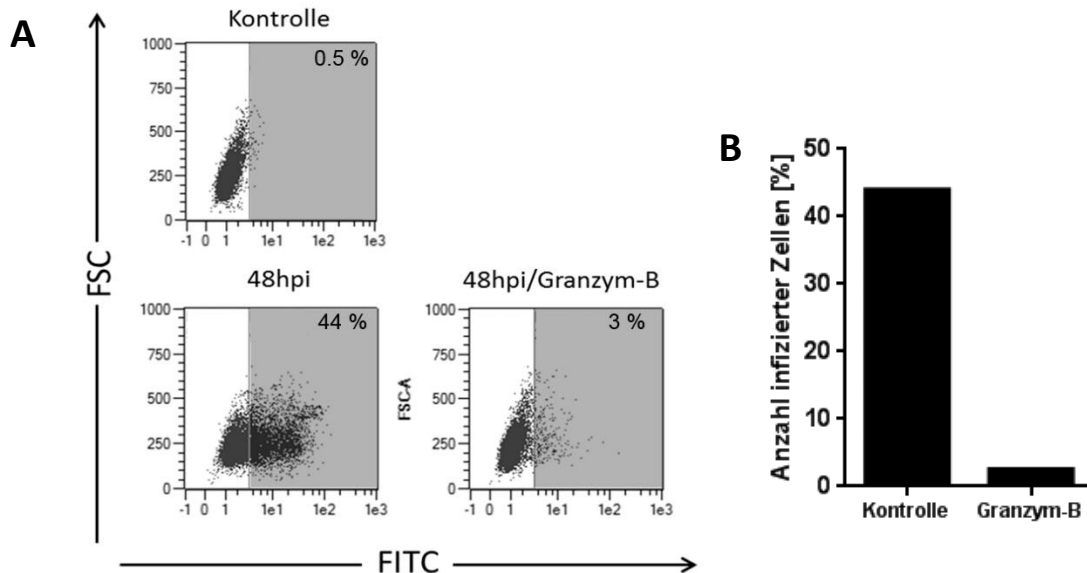


Abb. 4-45 Einfluss von Granzym-B auf die Infektiosität von Chlamydien

Durchflusszytometrische Analyse der Infektion von BGM-Zellen nach Granzym-B-Behandlung von Chlamydien mittels IMAGEN-Kit. *C. psittaci* EBs wurden für 4 h bei 37 °C mit Granzym-B (88 µg/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Chlamydien bei 14000 rpm für 20 min. Das in Zellkulturmedium resuspendierte Chlamydienpellet wurde in einer MOI von 30 für die 48 h Infektion von BGM-Zellen eingesetzt. (A) Repräsentative *Dotplot*-Analyse. Anhand der nicht-infizierten Kontrolle wurde das *Gate* zur Erfassung der Chlamydien-positiven Zellen ausgewählt. (B) Quantitative Analyse Chlamydien-positiver Zellen in %.

Wie in Abb. 4-45 zu sehen, führte die Inkubation chlamydialer EBs mit Granzym-B zu einem stark reduzierten Anteil infizierter BGM-Zellen, im Vergleich zur Infektion mit unbehandelten EBs. Während bei der Infektion von BGM-Zellen mit unbehandelten EBs 44 % der Zellen positiv für Chlamydien waren, konnten für die Infektion mit Granzym-B-behandelten EBs lediglich 3 % Chlamydien-positive Zellen gemessen werden (Reduktion von ≥ 90 %). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen der TEM-Analyse, die sehr stark auf eine Degradation chlamydialer Strukturen innerhalb der Granula hinweisen (Abb. 4-41) und stehen außerdem in Einklang mit der deutlich reduzierten Fähigkeit zur Infektion von BGM-Zellen (Abb. 4-44). Insgesamt sprechen die Daten dafür, dass Chlamydien in NK-Zellen zunächst mittels Granzym-B und möglicherweise weiteren Faktoren „inaktiviert“ und anschließend zusammen mit den lytischen Granula mittels Degranulierung freigesetzt werden.

4.3.6 Charakterisierung der durch NK-Zellüberstände ausgelösten Immunantwort

Die von NK-Zellen freigesetzten Chlamydien, verlieren aufgrund der lytischen Wirkung von Granzym-B und möglicherweise weiteren Enzymen der Granula ihre Infektiosität. Ausgehend davon kam die Frage auf, ob durch die freigesetzten Erreger noch eine zelluläre Immunantwort eingeleitet werden kann. Für die Aktivierung derselben sind DCs, als zellulärer Bestandteil des angeborenen Immunsystems, von entscheidender Bedeutung. In einer vorhergehenden Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *C. psittaci* zu einer funktionalen Reifung von DCs führt, welche sich zum einen durch die morphologische Differenzierung und zum anderen durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine kennzeichnet. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es während der Chlamydieninfektion in den funktional maturierenden DCs zu einer Hochregulation der MHCI-Expression sowie der MHCI-Oberflächenpräsentation kommt (Dorothee Fiegl, Dissertation). Um zu untersuchen, ob die von NK-Zellen freigesetzten Bakterien noch zu einer reifungsabhängigen Induktion der MHCI-Oberflächenexpression führen, wurden DCs für 48 h mit Zellkulturüberständen nicht-infizierter und infizierter NK-Zellen (48 hpi) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der MHCI-Oberflächenexpression am Durchflusszytometer.

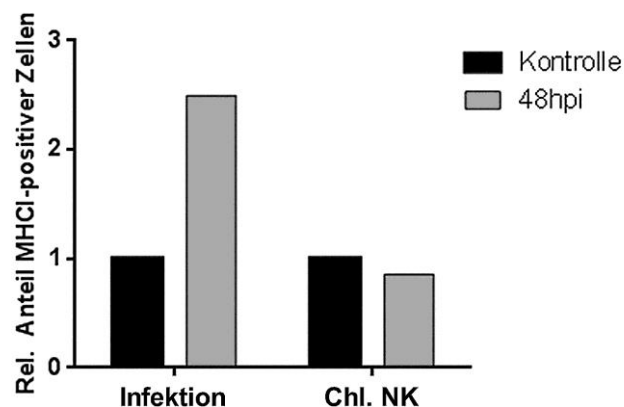


Abb. 4-46 MHCI-Expression von DCs nach Behandlung mit Chlamydien aus NK-Zellen

Durchflusszytometrische Analyse der MHCI-Oberflächenexpression von DCs nach Inkubation mit Chlamydien aus NK-Zellen. KY-2-Zellen wurden für 48 h mit *C. psittaci* (MOI 40) infiziert oder blieben nicht infiziert. Anschließend erfolgte die 48 h Inkubation von JAWSII-Zellen mit den Überständen nicht-infizierter, und Chlamydienpräparationen infizierter NK-Zellen (Chl. NK). Als Kontrolle wurden nicht infizierte, sowie *C. psittaci*-infizierte (MOI 10, 48 hpi) JAWSII-Zellen mitgeführt. Die Kontrollen wurden jeweils auf 1 gesetzt.

Wie in Abb. 4-46 ersichtlich, führte die Infektion von DCs, wie bereits in vorhergehenden Arbeiten gezeigt, zu einer deutlichen Induktion der MHCI-Oberflächenexpression im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (Faktor 2,5). Dies konnte jedoch für DCs, die mit Chlamydienpräparationen infizierter NK-Zellen inkubiert wurden, nicht beobachtet werden. Hier war der Anteil MHCI-positiver Zellen, im Vergleich zu DCs, die mit Überständen nicht-infizierter NK-Zellen behandelt wurden, sogar leicht reduziert. Damit stehen die Ergebnisse im Einklang mit früheren Untersuchungen, die anhand von Infektionsversuchen mit hitzeinaktivierten und PFA-behandelten Chlamydien gezeigt haben, dass für eine DC-Reifung intakte EBs essentiell sind (Dorothee Fiegl, Dissertation), (Datta et al. 2014). Die von NK-Zellen freigesetzten Chlamydien scheinen alleine also nicht zur Induktion der MHCI-Antigenpräsentation einer funktionalen DC-Reifung beizutragen. Hier bedarf es einem zusätzlichen Stimulus für die MHCI-Expression von DCs, wie IFN- γ (Dorothee Fiegl, Dissertation), das ebenfalls von NK Zellen nach chlamydialer Infektion produziert und sezerniert wird (Abb. 4-30, Abb. 4-35). Die oben beschriebenen Ergebnisse schließen zudem nicht aus, dass andere APCs, wie weitere DC-Subtypen, Monozyten, B-Zellen und/oder Makrophagen, durch "inaktivierte" Formen von Chlamydien funktional stimuliert werden und so zur Entstehung einer entsprechenden anti-chlamydialen Immunantwort führen (Yamaguchi et al. 2002), (Rey-Ladino et al. 2005), (Gervassi et al. 2004), (Johnson et al. 2018).

Basierend auf dieser Annahme schlossen sich nachfolgend *in vivo* Immunisierungsexperimente zur Untersuchung der möglichen Immunogenität NK-Zell-freigesetzter nicht-infektiöser Chlamydien an. Hierfür wurden C57BL/6-Mäuse in drei aufeinanderfolgenden Schritten intraperitoneal mit isolierten nicht-infektiösen Chlamydien aus NK-Zellen immunisiert. Parallel hierzu wurden Kontrollmäuse zu den entsprechenden Immunisierungszeitpunkten mit sterilem PBS (ohne Chlamydienzusatz) behandelt. Nach Tötung und Blutentnahme der Mäuse, wurden die erhaltenen Seren auf das Vorhandensein Chlamydien-spezifischer IgG-Antikörper getestet. Als Antigene wurden dafür zum einen Lysate infizierter und nicht-infizierter DCs (Abb. 4-47 A), zum anderen EBs und RBs (Abb. 4-47 B) eingesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Inkubation der Western-Blots mit Kontroll- bzw. Impfserum. Parallel wurden beide Seren auch in der Immunfluoreszenz auf die Erkennung chlamydialer Strukturen in infizierten BGM-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle wurden die Zellen dabei außerdem mit einem anti-Chlamydien-Antikörper angefärbt (Abb. 4-47 C). Letztlich wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft, ob eine Antikörpererkennung chlamydialer Antigene auf die intrazellulären Inklusionen und Kompartimente beschränkt ist oder auch möglicherweise die Oberfläche infizierter Zellen erfasst (Abb. 4-47 D).

Ergebnisse

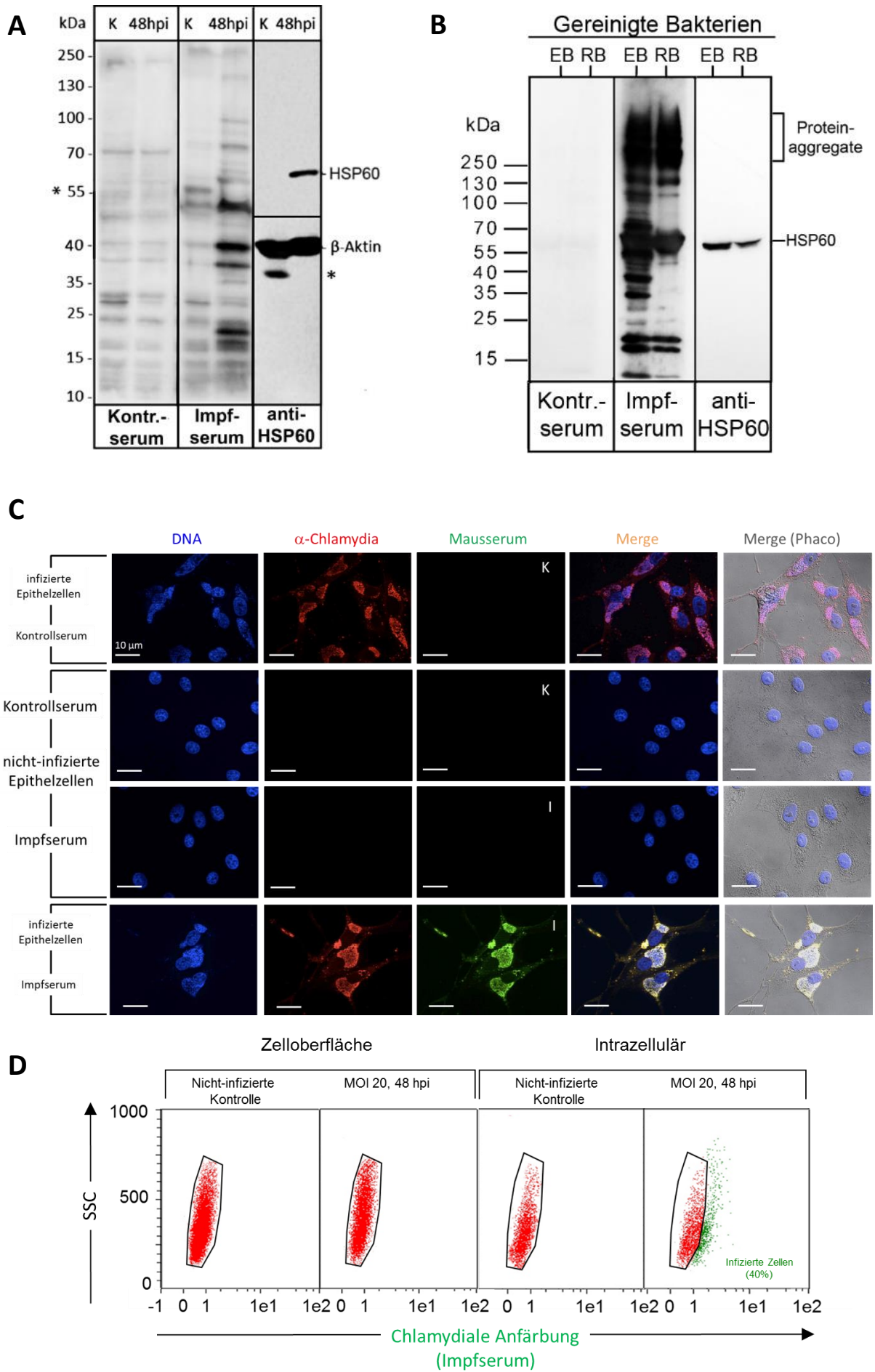


Abb. 4-47 Testen der Mausseren auf Chlamydien-spezifische Antikörper

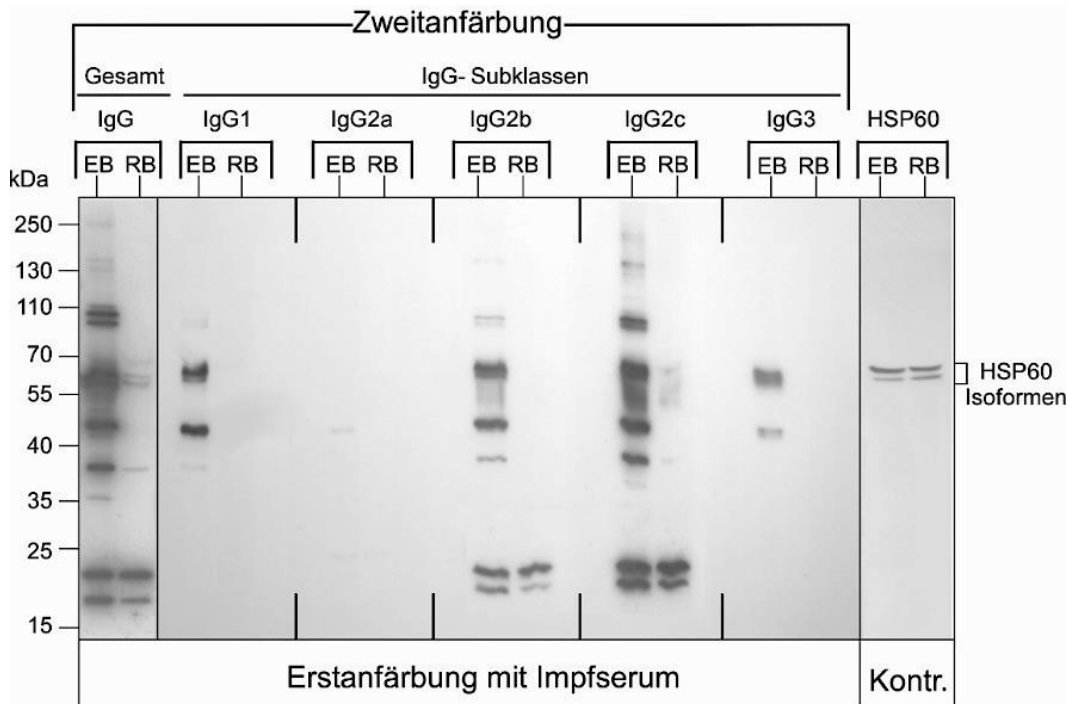
C57BL/6-Mäuse wurden drei Mal intraperitoneal mit 200 µl nicht-infektiösen Chlamydien aus NK-Zellen in PBS immunisiert. Parallel erfolgten Immunisierungsschritte an Kontrollmäusen mit sterilem PBS. Nach Tötung und Blutentnahme wurden die erhaltenen Seren in Western-Blot- (A, B) bzw. Immunfluoreszenz-Analysen (C) eingesetzt. Für die Western-Blot-Analysen wurden Lysate nicht-infizierter und *C. psittaci*-infizierter (MOI 10, 48 hpi) JAWSII-Zellen (A) oder aufgereinigte EBs und RBs (B) eingesetzt. Die Erstanfärbung erfolgte mit Kontroll- bzw. Impfserum. Als Sekundärantikörper kam ein anti-Maus-IgG-HRP-gekoppelter Antikörper zum Einsatz. Als Kontrolle wurde in beiden Experimenten zusätzlich mit einem anti-HSP60-Antikörper angefärbt. Der Stern kennzeichnet eine für β -Aktin aufgetretene unspezifische Bande. (C) BGM-Zellen wurden für 48 h mit *C. psittaci* infiziert (MOI 20) oder blieben nicht infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-Chlamydien-Antikörper für chlamydiale Strukturen (rot) und mit Kontroll- bzw. Impfserum (grün) angefärbt. K: Kontrollserum, I: Impfserum. D) Murine Epithelzellen (MN-R) wurden für 48 h mit *C. psittaci* infiziert (MOI 20). Für die durchflusszytometrische Analyse wurde der Chlamydiennachweis mittels Impfserum durchgeführt. Vor der Zugabe des Serums und des Sekundärantikörpers wurde eine Hälfte der Zellen permeabilisiert während die andere Hälfte unversehrt blieb. Zur Bestimmung Chlamydien-positiver Zellen wurden die nicht-infizierten Zellen mittels Kontrollexperiment identifiziert und von der Gesamtzahl aller untersuchten Zellen subtrahiert.

Wie in Abb. 4-47 A ersichtlich, erkannten die Antikörper des Kontrollserums bei Lysaten infizierter (Infektionslysate) und nicht-infizierter DCs (Kontrolllysate) ein nahezu identisches Proteinmuster. Dies lässt darauf schließen, dass durch das Kontrollserum keine Chlamydien-Proteine erkannt werden. Besonders interessant war jedoch der deutliche Unterschied, den das untersuchte Impfserum für die entsprechenden Kontroll- und Infektionslysate zeigte. Neben den diversen schwachen Proteinbanden, die bereits im Kontrolllysate sichtbar waren, kamen im Impflysat ≥ 15 weitere, zum Teil sehr ausgeprägte, Bandensignale hinzu (z.B. auf der Höhe von chlamydialem HSP60), die somit mit großer Wahrscheinlichkeit chlamydialen Proteinen zuzuordnen sind. Bei Verwendung gereinigter EBs und RBs als chlamydiale Antigene, konnten durch das Kontrollserum keine bzw. nur sehr schwache Proteinbanden detektiert werden (Abb. 4-47 B). Durch das Impfserum hingegen wurde eine große Bandbreite an Proteinen erkannt, wobei einige Proteine sowohl bei EBs, als auch bei RBs vorkamen, andere jedoch für EBs spezifisch zu sein schienen. Auffällig war, dass deutlich mehr Proteine der infektiösen Form (EB) erkannt wurden, als von der replikationsfähigen Form (RB). Auch mithilfe von Immunfluoreszenz-Analysen (Abb. 4-47 C) konnte gezeigt werden, dass weder das Kontroll-, noch das Impfserum Strukturen nicht-infizierter BGM-Zellen erkennt, dass jedoch das Impfserum in der Lage ist, Chlamydien-spezifische Strukturen zu detektieren. Durch Co-Lokalisationsstudien des Impfserums mit einem anti-Chlamydien-Antikörper, der ein *C. psittaci* Glykolipidantigen erkennt, zeigte sich, dass beide exakt dieselben Strukturen innerhalb der chlamydialen Inklusionen anfärben. Des Weiteren ergaben durchflusszytometrische Analysen (Abb. 4-47 D), dass infizierte Epithelzellen keine chlamydialen Strukturen auf ihrer Zelloberfläche tragen, die durch das Impfserum als Antigene erkannt werden. Nur nach Permeabilisierung ist das Impfserum in der Lage Chlamydien-infizierte Zellen zu detektieren. Dies unterstützt die Hypothese, dass sich Chlamydien innerhalb ihrer Inklusion der zellulären Umgebung weitestgehend entziehen

und ausschließlich einen kontrollierten Austausch mit den Wirtskompartimenten zulassen (Campbell et al. 1994). Zusammenfassend belegen die Daten, dass das Impfserum Chlamydien-spezifische Antikörper enthält und folglich die Immunisierung mit nicht-infektiösen NK-Zellüberständen eine Immunantwort in Mäusen auslöst.

Es stellte sich nun die wichtige Frage, welche Art der Immunantwort durch die von NK-Zellen freigesetzten Chlamydien während der Immunisierung initiiert wird. Für die Charakterisierung der Immunantwort eignet sich aufgrund ihrer unterschiedlichen biochemischen, immunologischen und physiologischen Eigenschaften, besonders die Analyse der verschiedenen Immunglobulin-Subklassen. Für Immunglobulin G (IgG) konnten in der Maus vier bzw. fünf Unterklassen identifiziert werden, von denen IgG1 eine Th2- und demnach humorale Immunität anzeigt, wohingegen IgG2a, b, c und IgG3 auf eine Th1- und damit zelluläre Immunität hinweisen (Fox 2006). Bei C57BL/6-Mäusen ersetzt IgG2c funktional das durch eine genomische Deletion nicht vorhandene IgG2a (Martin, Silva, and Lew 1997, Jouvin-Marche et al. 1989). Zur Identifizierung der beteiligten IgGs und der entsprechenden Immunantwort, wurden chlamydiale EBs und RBs zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot in einem ersten Schritt mit Impfserum inkubiert (Abb. 4-48 A). Die Zweitanfärbung erfolgte mit einem Antikörper, der alle bekannten Maus IgG-Isotypen erkennt, sowie Antikörpern, die spezifisch für die fünf IgG-Isotypen der Maus sind (Abb. 4-48 A). Die IgG-spezifischen Antikörper wurden in Verdünnungen von 1:2000 eingesetzt, die laut Hersteller eine vergleichbare Anfärbungsintensität der verschiedenen IgG-Moleküle bei gleicher Konzentration gewährleisten. Dies wurde in einem Western-Blot mit gereinigten IgG-Immunglobulinen getestet und bestätigt (Abb. 4-48 B). Als Kontrolle erfolgte außerdem die Anfärbung von chlamydialem HSP60, um sicherzustellen, dass vergleichbare Mengen an EBs und RBs geladen wurden (Fisher, Adams, and Maurelli 2015).

A



B

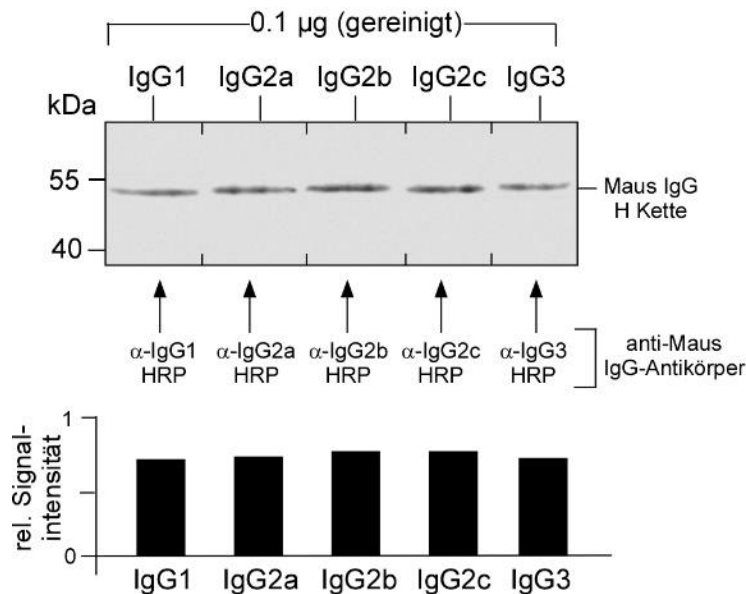


Abb. 4-48 Charakterisierung der Immunantwort

A) C57BL/6-Mäuse wurden drei Mal intraperitoneal mit 200 µl nicht-infektiosen Chlamydien aus NK-Zellen in PBS immunisiert. Parallel erfolgten Immunisierungsschritte an Kontrollmäusen mit sterilem PBS. Nach Blutentnahme der getöteten Mäuse wurden die erhaltenen Seren in der Western-Blot-Analyse eingesetzt. Als Antigene wurden aufgereinigte *C. psittaci* EBs und RBs eingesetzt. Die Erstanfärbung erfolgte mit Impfserum. Als Sekundärantikörper kamen anti-Maus-IgG-HRP-gekoppelte Antikörper mit verschiedener IgG-Isotypen-Erkennung zum Einsatz. Zusätzlich wurde als Ladekontrolle mit einem anti-HSP60-Antikörper angefärbt. (B) Die Vergleichbarkeit der Antikörper-Detektion für Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c und IgG3 wurde mit aufgereinigten Maus IgG-Subtypen (0,1 µg) im Western-Blot unter Verwendung der anti-Maus-IgG-HRP-gekoppelte Antikörper überprüft.

Wie in Abb. 4-48 A zu sehen, belegt die HSP60-Kontrolle, dass vergleichbare Mengen von EBs und RBs geladen wurden. Die Anfärbung mit dem anti-IgG-Antikörper, der alle Maus IgG-Isotypen detektiert, zeigt wie bereits zuvor in Abb. 4-47 B, dass infektiöse, extrazelluläre EBs wesentlich besser erkannt werden, als intrazelluläre RBs. Interessanterweise konnte bei der Analyse der verschiedenen IgG-Isotypen eine sehr unterschiedliche Stärke der Antigenanfärbung gezeigt werden. Die intensivste und deutlichste Anfärbung für EBs und RBs war für IgG2c zu finden, gefolgt von IgG2b. Wesentlich schwächere Bandenintensitäten für die Antigene von EBs und RBs wurden für IgG1 und IgG3 nachgewiesen. Für IgG2a konnte erwartungsgemäß keine entsprechende Anfärbung nachgewiesen werden (Martin, Brady, and Lew 1998), da dieses Immunglobulin bei C57BL/6-Mäusen, wie bereits oben erwähnt, nicht exprimiert wird (Jouvin-Marche et al. 1989, Martin, Silva, and Lew 1997). Das gefundene und durch Densitometrie quantifizierte Anfärnungsprofil der Antikörper ($\text{IgG2c} > \text{IgG2b} > \text{IgG1} \geq \text{IgG3}$, kein IgG2a) lässt mit seinen distinkten Intensitäten demnach auf unterschiedliche Mengen der beteiligten IgG-Subklassen schließen. Insbesondere scheinen bei der Immunantwort hauptsächlich IgG2c und IgG2b vertreten zu sein, was auf eine zelluläre Th1-vermittelte Immunantwort mit einer ausgeprägten Fähigkeit zur ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) und/oder CDC (*complement dependent cytotoxicity*) hindeutet (Fox 2006). Die Beobachtung in Abb. 4-47 D belegt jedoch, dass sich bei infizierten Epithelzellen keine chlamydialen Antigene auf der Plasmamembran befinden, welche durch das Impfserum erkannt werden. Dies lässt folgern, dass die Erkennung infizierter Epithelzellen durch NK-Zell-vermittelte ADCC vermutlich keine Rolle bei der anti-chlamydialen Immunabwehr spielt. Die funktionale Beteiligung einer Antigen-Neutralisierung in Verbindung mit Maskierung, Agglutination und/oder CDC scheint wahrscheinlicher zu sein. Abschließend wurde daher in dieser Promotionsarbeit untersucht, ob das Impfserum die Fähigkeit besitzt chlamydiale EBs zu neutralisieren und so eine zelluläre Infektion zu beeinträchtigen. Hierfür wurden chlamydiale EBs 2 h bei 4 °C, gefolgt von 2 h bei 37 °C mit Kontroll- bzw. Impfserum vorinkubiert oder blieben für die entsprechenden Inkubationsbedingungen in der Infektionskontrolle unbehandelt. Im Anschluss wurden die EBs in einer MOI von 20 für die Infektion empfänglicher Maus-Epithelzellen eingesetzt. Nach einer Kultivierungszeit von 48 h erfolgte die Analyse der zellulären Infektion mittels Durchflusszytometrie (Abb. 4-49).

Ergebnisse

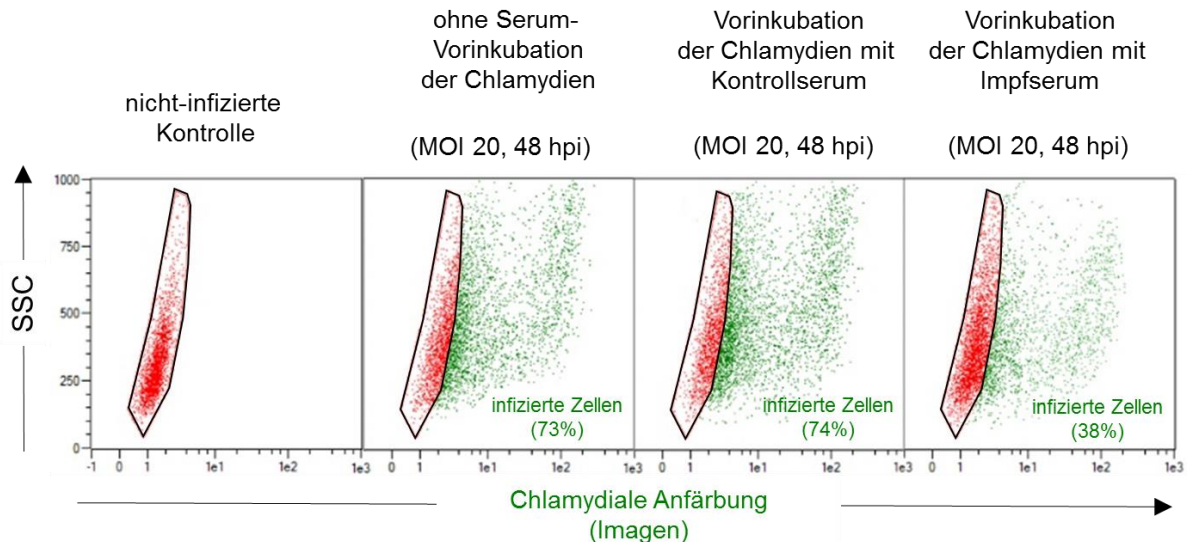


Abb. 4-49 Untersuchung der Funktion des Impfserums

Durchflusszytometrische Analyse der Infektion von Epithelzellen mit Serum-vorbehandelten oder unbehandelten Chlamydien mittels IMAGEN-Kit. Chlamydiale EBs (*C. psittaci*) wurden für 2 h bei 4 °C mit Kontroll- bzw. Impfserum vorinkubiert, gefolgt von einer 2 h Inkubation bei 37 °C oder blieben unbehandelt. 20 µl Serum (entsprechend 10^{13} Molekülen IgG) wurden dabei mit 20 µl (5×10^5 IFU) Chlamydien inkubiert. Die Kontrolle wurde mit 20 µl sterilem PBS behandelt. Anschließend wurden MN-R-Zellen für 48 h mit den Serum-vorbehandelten oder unbehandelten Chlamydien infiziert (MOI 20). Für die Bestimmung Chlamydien-positiver MN-R-Zellen wurde das Gate für nicht infizierte Zellen anhand der Kontrolle festgelegt (rot) und von der Gesamtzellzahl der infizierten Proben subtrahiert um den Anteil infizierter Zellen (grün) zu erhalten.

Wie in Abb. 4-49 ersichtlich, hatte die Vorbehandlung chlamydialer EBs mit dem Kontrollserum keinen Einfluss auf die Infektion von Epithelzellen. Die Infektionsrate war dabei genauso hoch wie beim Einsatz nicht vorbehandelter Chlamydien. Durch die Vorinkubation der Chlamydien mit Impfserum hingegen, konnte eine deutlich reduzierte Anzahl infizierter Zellen im Vergleich zur herkömmlichen Infektion beobachtet werden (Faktor 1,9). Folglich führte die Inkubation mit dem Impfserum zu einer 50 %-igen Neutralisierung chlamydialer EBs durch die oben identifizierten IgG-Isotypen (Abb. 4-48). Somit ist eine chlamydiale Neutralisierung durch einen oder mehrere der nachgeschalteten IgG-abhängigen Mechanismen naheliegend.

NK-Zellen scheinen folglich auf unterschiedlichen Ebenen die Immunantwort gegen Chlamydien zu unterstützen. Zum einen sind die NK-Zellen in der Lage, die von ihnen internalisierten Chlamydien in ihrem Entwicklungszyklus zu stören und in unschädlicher, d.h. nicht-infektiöser Form, wieder freizusetzen. Zum anderen können durch die hierbei ausgelöste Immunantwort (mit den freigesetzten anti-Chlamydien-Antikörpern) die noch verbliebenen infektiösen extrazellulären EBs über entsprechende Prozesse neutralisiert werden, wodurch die Pathogene ihre Fähigkeit zum Eintritt und zur Vermehrung in andere benachbarte Zellen verlieren.

5 Diskussion

5.1 Zelluläre Selbstverteidigung Chlamydien-infizierter DCs

Da bisher die genauen zellulären und biochemischen Abläufe der anti-chlamydialen Zellabwehr von DCs noch nicht verstanden und die beteiligten zellulären Faktoren hierbei weitestgehend unbekannt sind, wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit der xenophagosomale Abwehrmechanismus Chlamydien-infizierter DCs auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht. Verschiedene intrazelluläre Bakterien sind auf die mitochondriale Funktion ihrer Wirtszellen angewiesen, um Energie- und Nährstoffspeicher zu parasitieren (Winkler and Neuhaus 1999). So fehlt Chlamydien beispielsweise eine F1-F0-ATP-Synthase zur H⁺-getriebenen ATP-Synthese (Stephens et al. 1998) sowie Gene für die Biosynthese von Vitaminen, Purinen, Pyrimidinen und fast allen Aminosäuren (Eisenreich et al. 2013). Um diese essentiellen Komponenten aus der Wirtszelle zu importieren, exprimieren sie verschiedene Transporterproteine sowie ATP/ADP-Translokasen (Tjaden et al. 1999) und können zudem Mitochondrien der Wirtszelle direkt zu ihren Inklusionen rekrutieren (wie z.B. *C. psittaci*) (Abb. 4-8) (Matsumoto et al. 1991). Obwohl pathogene Chlamydien eine begrenzte Kapazität für eine unabhängige ATP-Synthese haben können (Omsland et al. 2014), ist bis heute unklar, in welchem Ausmaß "bakterielles ATP" zu ihrem Gesamtenergiebedarf beiträgt. Studien deuten darauf hin, dass ATP die Hauptenergiequelle während der ersten Phase der Chlamydieninfektion ist, während der bakterielle Metabolismus diese Importe möglicherweise während der Wachstumsphase ergänzen könnte (Gerard et al. 2002). Die Behandlung mit Antimycin A beeinträchtigt stark die Entwicklung und den Metabolismus von Chlamydien (Szaszak et al. 2011) und zeigt, dass die oxidative Phosphorylierung der Wirtszelle eine essentielle ATP-Quelle für das bakterielle Wachstum ist. Darüber hinaus hemmt die Suppression mitochondrialer Gene die Chlamydieninfektion (Derre et al. 2007). Folglich sind Chlamydien in obligatorischer Weise von Mitochondrien der Wirtszellen abhängig und die durch glykolytisches ATP bereitgestellte Energie ist unter normoxischen Bedingungen für die Chlamydien nicht ausreichend. Dies entspricht den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, die in Kapitel 4.1 gezeigt sind.

Aus den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich folgern, dass DCs die bakterielle Abhängigkeit von Mitochondrien nutzen, um eine intrazelluläre Chlamydien-feindliche Umgebung zu schaffen, die zur Destabilisierung der Vakuolen des Pathogens führt. Schließlich kommt es zur Zerstörung der chlamydialen Inklusionen durch cPLA2- und HDAC6-Aktivität infizierter Zellen (Abb. 4-2, Abb. 4-15) sowie zur Bildung gemischter Aggregate aus desintegrierten Chlamydienstrukturen und dysfunktionalen Mitochondrien (Abb. 4-17, Abb. 4-18, Abb. 4-19, Abb. 4-20). Diese Aggregate werden letztendlich mittels Autophagie degradiert (Abb. 4-5, Abb. 4-21). Weitere Resultate zeigen

zudem, dass dieser Prozess der Immunabwehr durch autokrine TNF-Signalisierung kontrolliert wird, die die Arachidonsäure-produzierende cPLA2 über p38 und ERK1/2 induziert und aktiviert (Danny Kagebein, Dissertation), (Radomski, Kagebein, et al. 2017). Eine TNF- α -gesteuerte cPLA2-Aktivierung wurde zuvor bereits für Makrophagen gezeigt (McPhillips et al. 2007), wo sie eine anti-mykobakterielle Abwehr über Apoptose vermittelt (Duan et al. 2001). Darüber hinaus wurde die TNF-Signalisierung mit der Dysfunktion von Mitochondrien in Verbindung gebracht (Mariappan et al. 2007). TNF- α -induzierte Arachidonsäure verändert die physikalischen Eigenschaften und die Dynamik von Membranen, modifiziert die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran, beeinflusst direkt die Energiekopplung und inhibiert letztlich die Cytochromkomplexe der Atmungskette (Di Paola and Lorusso 2006). Somit verursacht Arachidonsäure die Ansammlung von kompromittierten Mitochondrien mit einer defekten oxidativen Phosphorylierung (Abb. 4-9) (Hillered and Chan 1988), die schließlich durch Autophagie beseitigt werden (Lemasters 2007). Darüber hinaus steuern cPLA2 und sein Produkt die autonome Abwehr von Zellen über die Regulation immunitätsbezogener GTPasen (*immunity-related GTPases*, IRGs) (Vignola et al. 2010) und die Atg5-abhängige Autophagie (Qi et al. 2011). Da freie Fettsäuren eine antibakterielle Aktivität haben können (Desbois and Smith 2010), könnte Arachidonsäure auch das Wachstum und die Entwicklung von Chlamydien direkt beeinflussen. In Übereinstimmung mit einem solchen Szenario zeigen Arachidonsäure-behandelte Chlamydien eine geringfügig schwächere Infektiosität als unbehandelte Bakterien (Abb. 4-7).

Während der Reifung zeigen Chlamydien-infizierte DCs einen Pro-Überlebens-Phänotyp, der sich durch eine erhöhte Autophagie, einen niedrigen ROS-Spiegel (Abb. 4-11 B) sowie eine geringe Anzahl an apoptotischen Zellen auszeichnet (Abb. 4-11 C). Dies stimmt mit der Hypothese überein, dass Autophagie die Apoptose in bestimmten zellulären Kontexten durch den Abbau von defekten Mitochondrien unterdrücken kann (Maiuri et al. 2007). Die schädliche ROS-Produktion kann steigen, wenn diese Organellen dysfunktional werden (Sun et al. 2016). Ihre Entfernung durch Mitophagie verlängert das Zellüberleben durch eine Reduzierung der mitochondrialen Apoptose (Bin-Umer et al. 2014). In DCs führt die Chlamydieninfektion sowie die TNF- α - oder Arachidonsäure-Behandlung zu einer starken Hochregulation der Glykolyse, wodurch die ATP-Produktion, trotz des Verlusts funktioneller Mitochondrien, aufrechterhalten wird (Abb. 4-12). Somit führt die Infektion zu einer metabolischen Umprogrammierung von der oxidativen Phosphorylierung zur Glykolyse, die an den Warburg-Effekt erinnert (Warburg 1956). Die Aktivierung durch pro-inflammatorische Stimuli, verursacht eine ähnliche Verschiebung in Richtung Glykolyse und fördert somit das Überleben der Zelle (Pearce and Everts 2015). Da der Verlust der mitochondrialen Funktion außerdem mit einer verringerten phago-/endozytotischen Kapazität einhergeht (Chougnet et al. 2015), zielt die metabolische Umstellung wahrscheinlich auch auf die Aufnahme und Verarbeitung von Antigenen ab. Durch eine aktuelle Studie konnte die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete metabolische

Umprogrammierung infolge der Chlamydieninfektion von DCs bereits durch Arbeiten einer anderen Forschungsgruppe vollständig bestätigt werden (McKeithen et al. 2017). Zudem zeigten die Autoren, dass für diese Umprogrammierung das Inflammasom von entscheidender Bedeutung ist (McKeithen et al. 2017). Das Inflammasom kann durch TNF- α aktiviert werden (Alvarez and Munoz-Fernandez 2013) und aktiviert seinerseits MAPK wie ERK1/2 (Taxman et al. 2011), die, wie bereits oben beschrieben, zur Phospho-Aktivierung von cPLA2 und der Freisetzung von Arachidonsäure führen (Danny Kägebein, Dissertation), (Radomski, Kagebein, et al. 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass diese Art der zellulären Umprogrammierung zusätzlich kritische Auswirkungen auf die antibakterielle Immunabwehr hat (Abb. 4-7, Abb. 4-9, Abb. 4-10, Abb. 4-11). Der Prozess ermöglicht es infizierten DCs, ihre Infektion durch Modulieren der Wirtsumgebung einzudämmen. Dieses intrazelluläre Programm stellt vermutlich ein entscheidendes Merkmal der DC-Biologie dar, welches die Aufnahme von infektiösen Pathogenen für die Antigenpräsentation ermöglicht, während gleichzeitig das zelluläre Überleben und die Unterdrückung der mikrobiellen Ausbreitung sichergestellt werden.

Chlamydien nutzen das Zytoskelett der Wirtszelle, um ihr Überleben und ihre intrazelluläre Replikation zu fördern. Sie interagieren beispielsweise mit Mikrotubuli (MTs), um die Translokation der Inklusion von der Zellperipherie zum MTOC und Golgi-Apparat zu gewährleisten (Grieshaber, Grieshaber, and Hackstadt 2003). MT-abhängige Transportprozesse liefern Nährstoffe für die Pathogene (Saka and Valdivia 2010). Folglich führt eine Störung der Chlamydien-MTOC-Wechselwirkung zu nicht-produktiven, funktionell beeinträchtigten Bakterien (Leonhardt et al. 2007). Darüber hinaus werden chlamydiale Inklusionen von acetyliertem α -Tubulin umhüllt (Abb. 4-13) (Al-Zeer et al. 2014), das normalerweise in stabilisierten MT-Strukturen in naher Lokalisation zum MTOC/Golgi-Apparat zu finden ist (Cambray-Deakin and Burgoyne 1987). Die HDAC6-vermittelte Tubulin-Deacetylierung fördert den Abbau dieser stabilen MTs (Matsuyama et al. 2002). Wie Zellen die HDAC6-Aktivität modulieren, ist bisher noch unklar. Neuere Studien weisen darauf hin, dass TNF- α , das auch von Chlamydien-infizierten DCs sezerniert wird (Fiegl et al., 2013), HDAC6 induziert (Ding et al. 2013). Umgekehrt beeinflusst die HDAC6-Inhibition TNF- α -vermittelte *downstream*-Effekte (Yu et al. 2016). Darüber hinaus konnte für LPS die Regulation der Expression verschiedener HDACs, einschließlich HDAC6, in APCs gezeigt werden (Aung et al. 2006). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Chlamydieninfektion von DCs die HDAC6-Expression stark erhöht (Abb. 4-14). Dies führt zu einer dramatischen Veränderung der räumlichen Verteilung und Häufigkeit von acetylierten MTs. Im Gegensatz zu Epithelzellen sind Chlamydienstrukturen in DCs nicht von acetylierten, stabilen MTs umgeben und liegen räumlich entfernt vom MTOC und dem Golgi-Apparat (Abb. 4-13). Bemerkenswerterweise rekonstituiert die HDAC6-Inhibition in DCs Chlamydienkompartimente vollständig und imitiert den in Epithelzellen

beobachteten Phänotyp (Abb. 4-15). Dies legt die Vermutung nahe, dass die erhöhte HDAC6-Aktivität in DCs den Chlamydien acetylierte MTs entzieht, die für die strukturelle Stabilisierung ihrer Inklusion, Wachstum und Entwicklung benötigt werden. Darüber hinaus führt die Deacetylierung von MTs auch zum strukturellen Zusammenbruch von Vimentin (Rathje et al. 2014), einem weiteren Zytoskelettprotein, das zum Schutz des bakteriellen Kompartiments erforderlich ist (Kumar and Valdivia 2008). Der zeitlich parallele Ablauf der Induktion von cPLA2 (Verlust der mitochondrialen Funktion) und HDAC6 (Deacetylierung von stabilisierenden MTs) während der Infektion, deutet stark auf eine Kooperation beider Mechanismen bei der strukturellen Desintegration von Chlamydienkompartimenten hin. Daher scheint eine koordinierte Immunabwehr *downstream* des TNF- α -Signalweges die Vakuolen des Pathogens zu beeinträchtigen, d.h. sie zu destabilisieren und sie für eine mögliche Zerstörung vorzubereiten.

HDAC6 scheint auch eine Schlüsselkomponente für die autophagosomale Entsorgung zerfallener Chlamydienstrukturen zu sein und markiert Vimentin-haltige Aggresomen aus mitochondrialen und bakteriellen Überresten (Abb. 4-16, Abb. 4-18, Abb. 4-19). Seine Supprimierung führt zu einer reduzierten Autophagie und unterdrückt zudem die bakterielle Antigenpräsentation (Abb. 4-21, Abb. 4-22, Abb. 4-23 C). Frühere Studien haben einen Zusammenhang zwischen der Tubulin-Acetylierung und dem Zusammenbruch des Vimentinnetzwerks gezeigt, wobei beide Prozesse durch die Aktivität von HDAC6 beeinflusst zu werden scheinen (Rathje et al. 2014). Somit besteht vermutlich eine direkte funktionelle Verbindung zwischen der HDAC6-vermittelten MT-Destabilisierung und der intrazellulären Bildung von Vimentin-haltigen Aggregaten, die im Rahmen dieser Arbeit in infizierten DCs beobachtet wurden (Abb. 4-13, Abb. 4-14, Abb. 4-15, Abb. 4-16, Abb. 4-18, Abb. 4-19). Darüber hinaus spielt HDAC6 eine entscheidende Rolle für die autophagosomale Aggresomen-Entsorgung (Lee, Koga, et al. 2010). HDAC6 erkennt ubiquitinierte Aggregate und induziert die Expression zellulärer Chaperone, wie HSP25/27 (Boyault et al. 2007). HSP25/27 komplexiert mit HDAC6, reguliert die MT-Architektur, moduliert die Verteilung und Löslichkeit von Vimentin (Arrigo et al., 2013) und ist assoziiert mit Aggresomen (Ito et al. 2002).

Strukturell und funktionell geschädigte Mitochondrien werden selektiv durch Mitophagie abgebaut (Kim, Rodriguez-Enriquez, and Lemasters 2007). Dieser Prozess wird durch den Verlust von $\Delta\psi_m$ ausgelöst, der Pink-1 auf der äußeren Mitochondrienmembran stabilisiert. Pink-1 fungiert als Sensor für beschädigte Organellen und rekrutiert die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin (Pickrell and Youle 2015). Die Rekrutierung von Parkin erfordert auch die Bildung von mitochondrialen Aggregaten, sogenannten „Mito-Aggresomen“, die Aggresomen ähneln (Lee, Nagano, et al. 2010). Die Akkumulation von ubiquitinierten mitochondrialen Proteinen verursacht dann die Bindung des Adapterproteins p62, was wiederum die Interaktion mit LC3 vermittelt. Schließlich ermöglicht die LC3-Bindung den autophagosomalen Abbau der geschädigten Mitochondrien (Okatsu et al. 2010).

Interessanterweise zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass dieser Komplex der Mitophagie-Maschinerie einschließlich Pink-1 (Abb. 4-9 B, Abb. 4-18), Parkin (Abb. 4-20), Ubiquitin (Abb. 4-20), p62 (Abb. 4-20) und LC3 (Abb. 4-22) einem koordinierten *Targeting* zu desintegrierten Chlamydienstrukturen unterliegt. Dies lässt vermuten, dass die resultierende Autophagie-Kaskade eine Schlüsselrolle bei der Zerstörung bakterieller Überreste, zusammen mit assoziierten Mitochondrien und Aggregaten, spielt.

Autophagie zielt nicht nur auf zelleigene Strukturen, sondern ebenfalls auf eindringende Pathogene ab. Dieser Prozess wird auch als Xenophagie bezeichnet und stellt einen Abwehrmechanismus gegenüber intrazellulären Pathogenen, einschließlich *Chlamydia spp.*, dar (Fiegl et al. 2013), (Al-Zeer et al. 2013). Mitophagie und Xenophagie teilen sich wichtige molekulare Komponenten, einschließlich Parkin und p62 (Lazarou 2015) und *loss-of-function*-Mutationen von Parkin sind mit einer erhöhten Anfälligkeit für *Mycobacterium leprae* sowie *Salmonella enterica* verbunden (Kimmey and Stallings 2016). Manzanillo und Kollegen konnten zeigen, dass Parkin, in einer ähnlichen Weise wie während der Mitophagie, die Degradation von Bakterien in infizierter Zellen vermittelt (Manzanillo et al. 2013). Aufbauend auf diesen Ergebnissen lässt sich postulieren, dass DCs intrazelluläre Chlamydien über einen mito-xenophagosomalen Mechanismus eliminieren. In diesem Abbauprozess co-integrieren Mitochondrien und strukturell aufgelöste Inklusionen in aggresomalen Strukturen. Der Parkin/HDAC6/p62-Weg transferiert dabei die gebildeten Aggregate im Zuge des Weiteren proteolytischen Abbaus in Autophagosomen. Schließlich wird dieses antigenische Material in Amphisomen verbracht, einer weiteren Peptidprozessierung unterzogen und, wie zuvor beschrieben, vorwiegend auf Oberflächen-recycelte MHCI-Moleküle geladen (Fiegl et al. 2013). In Übereinstimmung damit ist die MHC-I-Präsentation chlamydialer Antigene von der TNF- α /p38/ERK1/2-Signalisierung (Danny Kägebein, Dissertation), (Radomski, Kägebein, et al. 2017), der cPLA2-Aktivität (Abb. 4-6), der Mito-Aggrephagie-assoziierten HDAC6/HSP25/27/Parkin-Maschinerie (Abb. 4-21, Abb. 4-22, Abb. 4-23) sowie den Autophagiefaktoren Beclin-1 und Atg7 (Danny Kägebein, Dissertation), (Radomski, Kägebein, et al. 2017) abhängig.

5.2 Beteiligung von iDexosomen an der Bekämpfung chlamydialer Zellinfektionen

Dexosomen sind durch ihre Vielzahl an Oberflächenmolekülen in der Lage, sowohl die angeborene, als auch die adaptive Immunantwort zu aktivieren und zu amplifizieren (Zitvogel et al. 1998). Da bisher keine Studien zur funktionalen Rolle von Exosomen Chlamydien-infizierter DCs (iDexosomen) vorliegen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von iDexosomen in der anti-chlamydialen Antwort untersucht (Kapitel 4.2). DCs setzen konstitutiv Exosomen frei (Chaput et al. 2006).

Verschiedene Studien belegen zudem, dass reife DCs kleinere Mengen an Exosomen produzieren als unreife DCs, was mit einer reduzierten Endozytoseaktivität und einer damit einhergehenden Umorientierung von multivesikulären Elementen begründet wird (Quah and O'Neill 2005). Im Kontrast hierzu zeigen die Daten dieser Arbeit, dass reife DCs infolge der Chlamydieninfektion deutlich mehr exosomale Vesikel freisetzen als unreife, nicht-infizierte DCs (Abb. 4-26 C, D). Exosomen entstehen durch Einstülpung endosomaler Membranen innerhalb von MVBs und werden durch Fusion mit der Plasmamembran freigesetzt. MVBs spielen außerdem eine essentielle Rolle für eine effiziente Autophagie, da sie für die Entstehung von Amphisomen aus Autophagosomen benötigt werden (Fader and Colombo 2009). Damit sind Exosomen sowohl funktionell als auch strukturell eng mit dem Autophagieweg verzahnt. Die erhöhte Exosomenfreisetzung im Rahmen der Chlamydieninfektion von DCs könnte folglich auf die, in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigte, Infektions-induzierte Hochregulation der Autophagie zurückzuführen sein (Danny Kägebein, Dissertation), (Radomski, Kägebein, et al. 2017). Für Chlamydien-infizierte Epithelzellen, die im Gegensatz zu infizierten DCs keine infektionsbedingte Induktion der Auto-/Xenophagie aufweisen (Rebekka Einenkel, Masterarbeit), wurde im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen eine reduzierte Exosomenfreisetzung beobachtet (Russell 2018). Dies deutet darauf hin, dass hier möglicherweise die Chlamydien als Energie- und Nährstoffparasiten in direkter oder indirekter Weise Einfluss auf die Exosomenbildung und/oder Freisetzung infizierter Wirtszellen nehmen. Tatsächlich zeigt eine Arbeit von Fader und Kollegen, dass bei Nährstoffmangel-bedingter Autophagieinduktion die Exosomensekretion der Zellen deutlich reduziert ist und MVBs in den autophagosomalen Weg eingespeist werden (Fader et al. 2008). ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) spielen eine bedeutende Rolle bei der Exosomenbiogenese sowie der Sortierung von Proteinen in MVBs/Exosomen (Juan and Furthauer 2018). Für Chlamydien konnte eine Interaktion mit der ESCRT-Maschinerie gezeigt werden, die für die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus der Pathogene von Bedeutung ist (Vromman et al. 2016). In DCs sind Chlamydien in ihrer Entwicklung stark beeinträchtigt und sind nicht in der Lage, ihren Lebenszyklus vollständig zu durchlaufen. Dass es infolge der Chlamydieninfektion von DCs nicht zu einer reduzierten Exosomenfreisetzung kommt, wie es für infizierte Epithelzellen beobachtet wurde (Russell 2018), könnte möglicherweise auch darauf zurückgeführt werden, dass es nicht mehr zu einer Chlamydien/ESCRT-Interaktion kommt und die ESCRT-Maschinerie uneingeschränkt für die Exosomenbiogenese zur Verfügung steht. Russells und Kollegen vermuten, dass das von den Energieparasiten bezogene ATP der Zelle für die Exosomenprozessierung fehlt, was sich letztendlich in einer reduzierten Exosomenfreisetzung manifestiert (Russell 2018). Möglicherweise ist die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete, erhöhte iDexosomen-Freisetzung darauf zurückzuführen, dass es im Laufe der Chlamydieninfektion zu einer metabolischen Umprogrammierung von der oxidativen

Phosphorylierung zur aeroben Glykolyse kommt (Abb. 4-12), die es den Pathogenen unmöglich macht, weiterhin auf die zellulären Energiespeicher zuzugreifen und damit die Exosomenproduktion/-freisetzung direkt oder indirekt zu manipulieren. Durch die aerobe Glykolyse wird zudem schneller ATP generiert (Zheng 2012), was möglicherweise der Exosomengenerierung/-freisetzung entgegenkommt. Neuere Studien belegen, dass die Exosomenfreisetzung von Krebszellen auf die erhöhte aerobe Glykolyserate, im Zuge des Warburg-Effekts, zurückzuführen ist (Wei et al. 2017). Hauptregulator scheint dabei der geringe pH-Wert in der Mikroumwelt der Tumorzellen zu sein, der durch die erhöhte Konzentration an Lactat zustande kommt (San-Millan and Brooks 2017). Damit stehen die Daten im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die ebenfalls eine erhöhte Lactatkonzentration in Chlamydien-infizierten DCs zeigen (Abb. 4-12 A).

Exosomen können entscheidend zur Verbreitung der Infektion beitragen und die Pathogenese fördern, da sie als Träger von Substanzen pathogener Herkunft agieren können (Schorey et al. 2015). Für verschiedene Bakterien konnte die „Verpackung“ von Virulenzfaktoren in Exosomen gezeigt werden. Von *Staphylococcus aureus*-infizierten Zellen stammende Exosomen beispielsweise beinhalten das bakterielle Poren-bildende Molekül α -Toxin und liefern diesen Virulenzfaktor an distale Orte der Infektion (Husmann et al. 2009). Exosomen *Bacillus anthracis*-infizierter Zellen transferieren den Virulenzfaktor *lethal factor* von Zelle zu Zelle, ohne Gefahr zu laufen, durch das Immunsystem des Wirts neutralisiert zu werden (Abrami et al. 2013). Für *Helicobacter pylori*-Infektionen konnte gezeigt werden, dass Exosomen den Virulenzfaktor CagA zu entfernten Organen und Geweben transportieren (Shimoda et al. 2016). Für Exosomen, die infolge der chlamydialen Infektion von Epithelzellen freigesetzt werden, wird ebenfalls eine Rolle in der Verbreitung chlamydialer Proteine postuliert. So konnten neben LPS und MOMP verschiedene zytotoxische und sekretierte Proteine in Wirtsvesikeln von *C. trachomatis*-infizierten Zellen nachgewiesen werden, wie u.a. Pgp3, CT159, CT166 und CPAF. Es wird angenommen, dass diese Virulenzfaktor-tragenden Exosomen entscheidend zur Pathogenese von *C. trachomatis* beitragen (Frohlich et al. 2012). Über die Rolle von Exosomen Chlamydien-infizierter DCs in der Verbreitung der Infektion und Pathogenese lagen bisher keine Daten vor. Interessanterweise konnten in dieser Arbeit in iDexosomen weder chlamydiale Antigene (LPS) (Abb. 4-28 B) noch Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. In der massenspektrometrischen Analyse wurde lediglich ein einziges bakterielles Porin identifiziert (s. Anhang). Aufgrund der Häufigkeit von nur zwei möglichen chlamydialen Peptidkandidaten kann dabei eher auf eine geringfügige Kontamination, die infolge der Aufreinigung der exosomalen Vesikel zustande kam, als von einer realen Anwesenheit chlamydialer Polypeptide geschlossen werden. iDexosomen scheinen folglich keine chlamydialen Virulenzfaktoren zu transportieren und somit auch nicht zur Pathogenese beizutragen. Eine vollständige Verpackung infektiöser EBs in Exosomen und die daraus resultierende Verbreitung der Infektion über exosomale Vesikel, wie sie für *C.*

pneumoniae gezeigt werden konnte (Ettelaie et al. 2007), wurde für iDexosomen ebenfalls nicht beobachtet. DCs charakterisieren sich, im Gegensatz zu Epithelzellen, durch ihre Fähigkeit chlamydiale Inklusionen zu desintegrieren und im Folgenden mittels Autophagie zu degradieren (Dissertation Danny Kägebein), (Radomski, Kägebein, et al. 2017). Dieser anti-chlamydiale Abwehrmechanismus führt zu einer frühzeitigen Unterbrechung des chlamydialen Entwicklungszyklus in DCs. Durch die daraus resultierende fehlende Interaktion mit ESCRT oder anderweitigen Faktoren, die für die Sortierung von Proteinen in MVBs/Exosomen benötigt werden (Katzmann, Babst, and Emr 2001), wird vermutlich die „Verpackung“ chlamydialer Virulenzfaktoren sowie infektiöser EBs in iDexosomen verhindert. Dies hat den Vorteil einer Verbreitung der Infektion sowie der Pathogenese entgegenzusteuern. Da iDexosomen frei von chlamydialen Antigenen sind, ist auch keine entsprechende Antigen-vermittelte Stimulation nicht-infizierter „Bystander“ DCs möglich, wie sie beispielsweise für Exosomen Chlamydien-infizierter Epithelzellen gezeigt werden konnte (Russell 2018).

Dexosomen können immunmodulatorische Eigenschaften auf verschiedene Immunzellen entfalten. Im Maussystem sowie an Krebspatienten wurde gezeigt, dass Dexosomen direkt NK-Zellen aktivieren können (Munich et al. 2012). Dexosomen exprimieren auf ihrer Oberfläche neben FasL und Trail außerdem TNF (Schwab et al. 2015). Die Interaktion von TNF auf der Oberfläche von Dexosomen mit dem entsprechenden TNF-Rezeptor auf NK-Zellen führt zur Induktion der IFN- γ Sekretion (Munich et al. 2012). Folglich können Dexosomen essentielle angeborene Immunfunktionen vermitteln. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Dexosomen Chlamydien-infizierter DCs ebenfalls transmembrangebundenes TNF exprimieren (Abb. 4-27 B) und über TNF/TNFR Interaktion zu einer massiv erhöhten IFN- γ Sekretion führen (Abb. 4-30). Somit tragen sie vermutlich entscheidend zur Aktivierung einer NK-Zellantwort während der Chlamydieninfektion bei. Die Interaktion erfolgt dabei vermutlich sowohl über TNFR1 als auch TNFR2 (Munich et al. 2012) und nicht, wie bei TM-TNF von DCs, lediglich über den TNFR2, welchem kürzlich neben der NK-Zellaktivierung eine bedeutende Rolle in der Induktion der IFN- γ Produktion humaner und muriner NK-Zellen zugeschrieben werden konnte (Almishri et al. 2016). Die Aktivierung von NK-Zellen ist ebenfalls durch lösliches TNF- α möglich. Gesunde Individuen zeigen sehr wenig bis kein bioaktives TNF im Serum. Bakterielle Produkte, wie LPS, führen jedoch zu einem schnellen Anstieg systemischer TNF-Level. Zellen der Monozyten-/Makrophagenlinie stellen die Hauptquelle an TNF unter diesen Bedingungen dar (Gerspach et al. 2000). Chlamydien-infizierte DCs sekretieren ebenfalls hohe Mengen dieses Zytokins (Dorothee Fiegl, Dissertation) und können somit zur IFN- γ Stimulation von NK-Zellen beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel von TM-TNF und die Stimulation von NK-Zellen durch Dexosomen um ein Vielfaches geringer ist, als durch parentale DCs (Xu et al. 2007). Der Vorteil einer Aktivierung durch TM-TNF von Seiten der Dexosomen gegenüber löslichem Zytokin könnte jedoch die multiple

Wirkung verschiedener membrangebundener Faktoren sein. Dexosomen interagieren dabei wie eine Art *Patch* mit der Zielzelle, wodurch eine spezifische kooperative Aktivierung/Interaktion ermöglicht wird. Beispielsweise exprimieren Dexosomen neben TM-TNF auch verschiedene Liganden für NK-Zell-aktivierende Rezeptoren, wie BAT3, MICA und MICB (Viaud et al. 2009), die möglicherweise, in Kooperation mit TM-TNF, zu einer effektiveren Aktivierung von NK-Zellen führen könnten.

TNF- α , welches sowohl von iDexosomen exprimiert (Lu et al. 2002) als auch in hohem Ausmaß von Chlamydien-infizierten DCs freigesetzt wird (Dorothee Fiegl, Dissertation), spielt u.a. eine entscheidende Rolle in der Modulation der Apoptose, indem es über die Zelloberflächenrezeptoren TNFR1 und TNFR2 seine biologischen Funktionen entfaltet. Das *Signaling* über TNFR1 initiiert dabei die Hauptfunktionen von TNF- α und führt entweder über Komplex II zur Apoptose oder über Komplex I zum Überleben der Zelle, während TNFR2 hauptsächlich Signale für das Zellüberleben vermittelt (Tartaglia and Goeddel 1992). Verschiedene Studien zeigen, dass IFN- γ den durch TNF α -vermittelten apoptotischen Effekt synergistisch erhöhen kann. Für mesenchymale Stammzellen konnte gezeigt werden, dass IFN- γ den TNFR2-NF- κ B-Weg und die Fas-Internalisierung inhibiert und dadurch synergistisch den apoptotischen Effekt von TNF- α erhöht (Liu et al. 2011). Eine weitere Studie weist eine Hochregulation von TNFR1 durch IFN- γ nach, durch die die apoptotischen Effekte von TNF- α amplifiziert werden (Bode, Murch, and Freeze 2006). Der synergistische Effekt von IFN- γ beruht zudem auf der Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (Cao et al. 2015). In Einklang mit diesen Daten zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das TNF- α infizierter DCs in Kombination mit dem durch iDexosomen induzierten IFN- γ co-kultivierter NK-Zellen zu einer erhöhten Apoptoseinduktion nicht-infizierter, interessanterweise aber auch Chlamydien-infizierter Epithelzellen führt (Abb. 4-32). Chlamydien blockieren die TNF-vermittelte Apoptose durch die Hochregulation von Mcl-1, welches die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran verhindert, sowie durch die Hochregulation von cIAP-2, was zur direkten Blockierung der Caspase-3-Aktivierung führt (Rajalingam et al. 2007), (Rajalingam et al. 2006). Zudem wird die TNFR1-Oberflächenexpression während der Chlamydieninfektion in Epithelzellen herunterreguliert (Paland et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die kombinatorische Wirkung von TNF- α und IFN- γ die chlamydiale Subversion der Apoptose infizierter Zellen zu einem gewissen Teil „ausgehebelt“ werden kann.

Es ist bekannt, dass IFN- γ die Persistenz von Chlamydien induzieren kann (Beatty et al. 1994). Die IFN- γ -induzierte Persistenz geht auf eine, durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)-vermittelte, Tryptophan-Depletion zurück (Byrne, Lehmann, and Landry 1986). Durch den Mangel der für die Pathogene essentiellen Aminosäure wird das Wachstum der Chlamydien stark beeinträchtigt (Shemer and Sarov 1985). Je nach IFN- γ -Konzentration und -Einwirkzeit resultiert der Tryptophan-

Mangel dabei in der Induktion der Persistenz oder der Beseitigung der Erreger. Eine ähnliche Wirkung konnte außerdem für TNF- α gezeigt werden (Shemer-Avni 1989). Sowohl für INF- γ als auch für TNF- α kann der anti-chlamydiale Effekt durch die externe Zugabe von Tryptophan wieder aufgehoben werden (Shemer 1987), (Shemer-Avni 1989). Der durch TNF- α bzw. INF- γ induzierte anti-chlamydiale Effekt ist demnach zeitlich begrenzt und macht eine Reaktivierung der Pathogene wahrscheinlich. Zudem wirkt sich die INF- γ -induzierte Autophagie in bereits infizierten Zellen förderlich auf die Entwicklung der chlamydialen Pathogene in späten Phasen des bakteriellen Zyklus aus (Rebekka Einkenkel, Masterarbeit). Der in dieser Arbeit gezeigte synergistische apoptotische Effekt von TNF- α und INF- γ hingegen hat den Vorteil, infizierte Zellen endgültig zu eliminieren und somit die bakterielle Infektion sowie deren Verbreitung einzudämmen. Tatsächlich zeigen neuere Studien, dass eine prämatüre Apoptose Chlamydien-infizierter Zellen die bakterielle Entwicklung hemmt (Ying et al. 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die TNF- α /INF- γ -vermittelte Apoptoseinduktion in nicht-infizierten Zellen deutlich höher war als in infizierten Zellen (Abb. 4-32). Chlamydien sind als obligat intrazelluläre Bakterien essentiell auf Wirtszellen angewiesen (Fields, Heinzen, and Carabeo 2011). Die Eliminierung nicht-infizierter Zellen, die sich in unmittelbarer Umgebung des Infektionsorts befinden, könnte demzufolge einer Ausbreitung der Bakterien entgegenwirken. Eine solche Art der zellulären Pathogenabwehr, die als sogenannte „Hypersensitive Response“ (HR) bezeichnet wird, ist insbesondere aus dem Pflanzenreich bekannt und wird analog zum angeborenen Immunsystem von Tieren gesehen. Dieser Mechanismus der Pflanzenabwehr gegen mikrobielle Pathogene zeichnet sich durch das rapide Absterben von Zellen in unmittelbarer Nähe der Infektion aus, wodurch einer Verbreitung auf andere Pflanzenteile entgegengewirkt wird (Morel and Dangl 1997). Neuere Studien beschreiben einen analogen Mechanismus der Infektionseindämmung auch für *Mycobacterium tuberculosis*-Infektionen humaner Makrophagen (Kelly et al. 2008). In der Tat liegen für Chlamydien Untersuchungen vor, die zeigen, dass Zell-zu-Zell-Kontakt die chlamydiale Zellinfektion und ihre Verbreitung erhöht (Puolakkainen et al. 2003) und die inflammatorische Immunantwort mit Sekretion von TNF- α eine Apoptose von noch nicht-infizierten Zellen im Bereich infizierter Gewebe auslöst (Perfettini et al. 2003), (Perfettini et al. 2000), die durch Blockade des Zytokins entsprechend aufgehoben werden kann (Darville, Andrews, and Rank 2000) und dann zu einer deutlichen Verschlechterung der Infektionssituation führt (Williams et al. 1990).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit darauf hin, dass das TNF- α infizierter DCs in Zusammenarbeit mit dem durch iDexosomen induzierten INF- γ der NK-Zellen einer chlamydialen Apoptosesubversion entgegenwirken kann und so möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Zell-zu-Zell-Ausbreitung chlamydialer Infektionen nimmt.

5.3 Prozesse anti-chlamydialer Abwehr infizierter NK-Zellen

NK-Zellen sind als Effektor-Lymphozyten Teil des angeborenen Immunsystems und spielen eine bedeutende Rolle in der Kontrolle verschiedener Tumorarten sowie mikrobieller Infektionen (Vivier et al. 2008). Trotz ihrer bedeutenden Beteiligung an der frühen Immunantwort viraler und bakterieller Infektionen, liegen bis heute kaum Studien über die direkte Infektion von NK-Zellen durch mikrobielle Pathogene vor. Renoux und Kollegen konnten die CD16-abhängige Internalisierung humaner Papillomaviren in NK-Zellen zeigen (Renoux et al. 2011). Der Fokus dieser Studie lag dabei eher auf der Analyse der Virus-vermittelten Aktivierung von NK-Zellen als auf der Untersuchung der Zellinfektion. Für Influenza-Virus A hingegen konnte ein Eintritt in primäre humane NK-Zellen über Clathrin- und Calveolin-vermittelte Endozytose nachgewiesen werden. Diese direkte Infektion führte letztendlich zur Apoptose der NK-Zellen (Mao et al. 2009). Auch die Vaccinia Virus-Infektion resultiert in einer negativen Modulation der NK-Zellfunktion (Kirwan et al. 2006). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen erstmalig die Infektion von NK-Zellen durch bakterielle Pathogene (Abb. 4-33, Abb. 4-34). Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Virusinfektionen kam es im Falle der Chlamydieninfektion jedoch nicht zu einer Modulation der NK-Zellfunktion. Vielmehr konnte in dieser Arbeit ein bislang unbekannter Mechanismus der Pathogen-Eliminierung identifiziert werden, bei dem sich NK-Zellen ihrem ursprünglichen Mechanismus der Degranulierung bedienen, um die Chlamydien mittels lytischer Granula zu inaktivieren und freizusetzen (Kapitel 4.3).

Der zugrundeliegende Mechanismus lässt sich möglicherweise aus bereits bestehenden Erkenntnissen von Epithelzellen ableiten. Die Infektion von Epithelzellen charakterisiert sich u.a. dadurch, dass die Chlamydien etwa zwei Stunden nach Eintritt in die Zelle mit Sphingomyelin-positiven exozytotischen Vesikeln der Wirtszelle fusionieren, die sich auf dem Weg vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran befinden. Dadurch verhindern sie die Fusion mit endozytotischen Vesikeln und letztlich den lysosomalen Abbau (Hackstadt, Scidmore, and Rockey 1995), (Hackstadt et al. 1996). Durch die Modifizierung der Inklusionsmembran, u.a. durch die Abspaltung verschiedener Rab-Proteine, wie z.B. Rab4, verhindern die Pathogene zudem den schnellen Rücktransport zur Plasmamembran (Molleken and Hegemann 2017). Weitere Interaktionen mit der Wirtszelle ermöglichen ihnen zudem den Mikrotubuli-abhängigen Transport zum MTOC, wo es zur homotypischen Fusion und zur Etablierung der Inklusion in der Nähe des Golgi-Apparates kommt (Richards, Knowlton, and Grieshaber 2013). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es in NK-Zellen zu keinem Infektionszeitpunkt zur Etablierung einer chlamydialen Inklusion kommt (Abb. 4-33 B, Abb. 4-41) und dass zudem der Transport der Chlamydien zum MTOC ausbleibt. Ferner blieben die Inklusionen, die ausschließlich EBs enthielten, in naher Lokalisation zur Plasmamembran und fusionierten dort mit exozytotischen Vesikeln, die positiv

für COPI waren (Abb. 4-37). Diese Beobachtung geht konform mit Studien an Epithelzellen, die zeigen, dass es noch vor der EB/RB-Differenzierung zu einer Fusion von Chlamydien mit exozytotischen Vesikeln kommt (Scidmore et al. 1996) und eine gewisse Präferenz für die Fusion mit COPI-positiven Vesikeln besteht, da diese für das chlamydiale Wachstum von Bedeutung sind (Saka and Valdivia 2010). Die vorliegenden Daten bestätigen, dass chlamydiale Inklusionen in Epithelzellen mit COPI co-lokalisieren (Daten nicht gezeigt). COPI-Hüllproteine haben, neben einer Reihe anderer Funktionen, eine bedeutende Rolle in der regulierten Sekretion (Beron et al. 2001). Zudem wurde deren Präsenz in der Membran unreifer sekretorischer Granula gezeigt (Martinez-Menarguez et al. 1999). Folglich scheinen Chlamydien in NK-Zellen, wie in Epithelzellen auch, bereits kurz nach Eintritt in die Wirtszelle mit COPI-positiven Vesikeln zu fusionieren (Abb. 4-37). Im Falle der NK-Zellen beinhalten diese ebenfalls Granzyme und Perforin (Topham and Hewitt 2009), die anti-mikrobielle Eigenschaften besitzen und es somit den Pathogenen nicht erlauben, die Vesikel zu modifizieren und einen Transport in Richtung MTOC einzuleiten. Für *E. coli*, *L. monocytogenes* und *M. tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass Granzym-B, nach dem durch Granulysin-vermittelten Eintritt in die Bakterien, ein hoch konserviertes Set an bakteriellen Proteinen spaltet. Dieses enthielt vorwiegend Proteine, die eine bedeutende Rolle in der Biosynthese und dem Metabolismus der Pathogene spielen und somit entscheidend für das bakterielle Überleben sind (Dotiwala et al. 2017), (Walch et al. 2015). Einhergehend damit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Granzym-B-behandelte Chlamydien (Abb. 4-45), ebenso wie Chlamydien aus NK-Zellen, keine Infektionen mehr in Epithelzellen hervorrufen (Abb. 4-44).

Während für virale Infektionen gezeigt werden konnte, dass sowohl der direkte, als auch der indirekte Weg (mithilfe co-stimulatorischer Signale) der NK-Zellaktivierung zur Kontrolle viraler Infektionen beiträgt, wird dies für bakterielle Infektionen noch kontrovers diskutiert. Die indirekte Aktivierung von NK-Zellen durch Bakterien ist für die verschiedensten Pathogene beschrieben, wie u.a. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Mycobacterium tuberculosis* und *M. bovis* BCG und erfordert die TLR-vermittelte Aktivierung von DCs und Monozyten, die ihrerseits IL-12, IL-18 und Typl-Interferone sekretieren (Newman and Riley 2007). Ob Bakterien zur direkten NK-Zellaktivierung führen können, ist bis heute unzureichend charakterisiert worden. Da Mikroben eine Reihe an potenziellen Liganden für TLRs und andere PRRs liefern und gezeigt werden konnte, dass auch NK-Zellen TLRs exprimieren, wäre eine direkte Aktivierung von NK-Zellen durchaus möglich. Tatsächlich zeigt eine Studie von Marcenaro und Kollegen, dass die Erkennung von *Mycobacterium bovis* mittels TLR2 zur direkten Aktivierung von NK-Zellen führt (Marcenaro et al. 2008). In Einklang damit zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, dass NK-Zellen ohne zusätzliche co-stimulatorische Signale direkt durch Chlamydien aktivierbar sind. Dies spiegelte sich in einer erhöhten IFN- γ - und Perforin-Expression (Abb. 4-35 A), IFN- γ -Sekretion (Abb. 4-35 B)

sowie einem erhöhten CD146-Transkriptlevel wider (Abb. 4-35 C). Eine ähnliche Aktivierung konnte nach der CD16-abhängigen Internalisierung des humanen Papillomavirus gezeigt werden, die ebenfalls in einer erhöhten zytotoxischen Aktivität und IFN- γ -Sekretion der NK-Zellen resultierte (Renoux et al. 2011).

Die frühe IFN- γ -Produktion ist ein entscheidender Schritt in der immunologischen Abwehr verschiedener Pathogene, wie intrazellulären Bakterien, Viren und Pilzen (Horowitz, Stegmann, and Riley 2011). Während der Chlamydieninfektion stellen NK-Zellen die Hauptquelle der frühen IFN- γ -Produktion dar (Tseng and Rank 1998). IFN- γ inhibiert das *C. trachomatis*-Wachstum in Zellkultur (Morrison 2000) und ist entscheidend für die Klärung der Infektion *in vivo* (Johansson et al. 1997a), (Johansson et al. 1997b). Durch verschiedene experimentelle Systeme konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von IFN- γ zu einer höheren bakteriellen Ladung, reduzierten IgG2a-Leveln, einer Verbreitung der Infektion und Defekten in der Entwicklung protektiver Immunität führt (Hook, Matyszak, and Gaston 2005). Die indirekte NK-Zellaktivierung durch Chlamydien-stimulierte PBMCs und die daraus resultierende IFN- γ -Sekretion sowie Lyse *C. trachomatis*-infizierter Epithelzellen, konnte bereits gezeigt werden (Hook et al. 2004). Ein offensichtlicher immunologischer Nutzen, der in dieser Arbeit erstmalig beobachteten direkten NK-Zellaktivierung durch Chlamydien, könnte die wesentlich schnellere Freisetzung von IFN- γ und die damit verbundene zügigere Th1-Antwort sein. Weiterhin können durch in frühen Infektionsphasen sekretiertes IFN- γ noch unreife Bystander DCs stimuliert werden, wodurch das Immunproteasom aktiviert wird (Kloetzel and Ossendorp 2004) und folglich die MHC-I-vermittelte Aktivierung zytotoxischer Lymphozyten schneller und spezifischer/zielgerichteter von statten gehen könnte. Des Weiteren ist es möglich, dass durch die direkte Aktivierung der NK-Zellen, infizierte Epithelzellen schneller mittels zytotoxischer Aktivität eliminiert werden können, was ebenfalls eine Infektionseindämmung zur Folge hätte. Der IFN-Rezeptor wird von fast allen Zellen exprimiert (Bach, Aguet, and Schreiber 1997). Durch Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor erfolgt eine Signaltransduktion, die zur Aktivierung der Expression von mehreren hundert Interferon-stimulierten Genen (ISG) führt (Schoggins and Rice 2011). Durch diesen Mechanismus kann beispielsweise die IFN- γ -induzierte Persistenz verschiedener Chlamydienstämme (wie z.B. *C. psittaci*, *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*), die auf eine durch IDO-vermittelte Tryptophan-Depletion zurückgeht (Byrne, Lehmann, and Landry 1986), einer Verbreitung der Pathogene entgegenwirken. IFN- γ induziert durch die Aktivierung von ISGs zudem Autophagie in Epithelzellen. Während Chlamydien-infizierte Epithelzellen nicht mittels IFN- γ -induzierter Autophagie vor einer Infektion geschützt werden können, sind nicht-infizierte Epithelzellen in der Lage, die Infektion, ähnlich wie DCs, abzuwehren (Rebekka Eienkel, Masterarbeit). Durch die schnellere IFN- γ -Sekretion infolge der direkten NK-Zellaktivierung könnten somit noch nicht infizierte Epithelzellen durch die Autophagieinduktion vor einer anstehenden Infektion geschützt werden. Auch die

Aktivierung der Guanylat-bindenden Proteinen (GBPs) durch IFN- γ trägt wesentlich zur Lyse der Inklusionsmembran und somit zur Beseitigung des Pathogens bei (Haldar et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass NK-Zellen nach Erstinfektion und Regeneration ihre Fähigkeit beibehalten, Chlamydien mittels Degranulierung freizusetzen und ihre Infektion nachhaltig zu klären (Abb. 4-43). Zum heutigen Zeitpunkt liegen keine Studien zu einem möglichen funktionalen Recycling von NK-Zellen infolge einer Infektion vor. Dass NK-Zellen wiederholt an einer Immunantwort teilnehmen können, belegen neuere Studien, die zeigen, dass es sich bei NK-Zellen, wie lange Zeit angenommen, nicht um kurzlebige Effektorzellen, sondern vielmehr um langlebige Zellen handelt, die ein Immungedächtnis ausbilden können (O'Sullivan, Sun, and Lanier 2015). Dieses, auch als trainierte Immunität bezeichnete NK-Zell-Gedächtnis, konnte sowohl infolge der Hapten-Vorbehandlung als auch infolge der initialen Stimulation mit IL-12 und IL-18 anhand einer erhöhten IFN- γ -Produktion nach erfolgter Restimulation mit den entsprechenden Zytokinen oder Liganden für aktivierende Rezeptoren gezeigt werden (O'Sullivan, Sun, and Lanier 2015). Durch die Infektion von NK-Zellen mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) konnte ebenfalls nach Restimulation eine erhöhte IFN- γ -Sekretion und zudem eine gesteigerte Zytotoxizität nachgewiesen werden (O'Sullivan, Sun, and Lanier 2015). Erste Studien zeigen außerdem die Aktivierung des NK-Zellgedächtnisses infolge bakterieller Infektionen, wie beispielsweise mit den Erregern *M. tuberculosis* (Venkatasubramanian et al. 2017) und *Ehrlichia muris* (Habib et al. 2016). In Übereinstimmung damit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit nach der Reinfektion von NK-Zellen mit Chlamydien eine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu erst-infizierten NK-Zellen (Abb. 4-43 B), was einen ersten Hinweis für die mögliche Ausbildung eines Gedächtnis-ähnlichen Phänotyps während der Chlamydieninfektion liefert. Anders als für Hapten- und Virus-stimulierte NK-Zellen (O'Sullivan, Sun, and Lanier 2015) war hier jedoch keine zusätzliche Stimulation durch pro-inflammatorische Zytokine notwendig. Vielmehr schien die Infektion der Zellen für die Ausbildung eines NK-Zellgedächtnisses auszureichen. Weiterführende Studien werden Aufschluss darüber geben, durch welche Faktoren und Interaktionen es zur Ausbildung der Gedächtnisfunktion von NK-Zellen während bakterieller Infektionen kommt.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass die von NK-Zellen aufgenommenen und mittels Degranulierung wieder freigesetzten Chlamydien nicht mehr in der Lage sind, eine Infektion bei Epithelzellen auszulösen (Abb. 4-44). Dies kann auf eine Zersetzung chlamydialer Proteine innerhalb lytischer Granula durch Granzym-B (Abb. 4-45) und ggf. weitere Faktoren zurückgeführt werden. Lytische Granula werden auch oft als "sekretorische Lysosomen" bezeichnet, da sie zahlreiche Charakteristika von Lysosomen aufweisen (Krzewski and Coligan 2012). So enthalten die Granula von NK-Zellen neben der Serinprotease Granzym B auch lysosomale Cathepsine sowie verschiedene lysosomale Hydrolasen (z.B. α -Glucosidase und saure Phosphatase) (Krzewski and Coligan 2012).

Durch die Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit inaktivierten EBs aus NK-Zellen konnte eine IgG-vermittelte Immunantwort ausgelöst werden, bei der hauptsächlich IgG2c und IgG2b vertreten waren, gefolgt von einer schwächeren IgG1- und IgG3-Antwort (Abb. 4-48 A). Das erhaltene Antikörperprofil deutet somit auf eine Th1-vermittelte Immunantwort hin. Bisher ist ungeklärt, welche Immunzellen maßgeblich an der Auslösung der Th1-vermittelten Immunantwort infolge der Immunisierung mit inaktivierten EBs aus NK-Zellen beteiligt sind. Dass eine Hochregulation der MHCII-Expression durch inaktivierte Chlamydien aus NK-Zellen bei DCs nicht mehr möglich ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits belegt werden (Abb. 4-46). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die zeigen, dass hitzeinaktivierte und PFA-behandelte Chlamydien keine DC-Reifung mehr hervorrufen und dafür intakte EBs essentiell sind (Dorothee Fiegl, Dissertation). Studien mit UV-inaktivierten EBs zeigen, dass diese zu einer hohen MHCII-Expression führen, jedoch niedrige Level an co-stimulatorischen Molekülen, wie CD40 und CD86 exprimieren, niedrige Level pro-inflammatorischer Zytokine sekretieren und somit zu einer schlechteren CD4⁺ T-Zellaktivierung führen (Rey-Ladino et al. 2005). Es ist daher wahrscheinlich, dass die MHCII-vermittelte Präsentation der Antigene inaktivierter EBs vorwiegend durch Makrophagen und B-Zellen erfolgt. Die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen wird hauptsächlich durch IL-12, in Abwesenheit von IL-4 und TGFβ vermittelt (Zhu, Yamane, and Paul 2010). DCs können durch die Aufnahme hitzeinaktivierter Chlamydien noch zur IL-12-Sekretion angeregt werden (Lu and Zhong 1999). Weiterhin stellen aktivierte Makrophagen Produzenten dieses Zytokins dar. Zentrales Zytokin der Th1-Antwort ist IFN-γ, welches vorwiegend von Th1-Zellen und NK-Zellen produziert wird (Billiau and Matthys 2009) und zur Förderung der inflammatorischen Antwort, Klärung intrazellulärer Pathogene und einem Klassenswitch zu IgG2a, IgG2b und IgG3 führt (Pollard et al. 2013). Es ist anzunehmen, dass das im Rahmen der Immunisierung freigesetzte IFN-γ hauptsächlich von Th1-Zellen und ferner von NK-Zellen sekretiert wird, da die Aktivierung von NK-Zellen während der Chlamydieninfektion durch IL-12 von Seiten der DCs (und ggf. Makrophagen) und IL-18 von Seiten infizierter Epithelzellen erfolgt (Hook, Matyszak, and Gaston 2005). Epithelzellen sind jedoch nur nach Infektion mit intakten (infektiösen) EBs in der Lage IL-18 freizusetzen (Lu, Shen, and Brunham 2000), ähnliche Ergebnisse wurden für DCs beschrieben, die ebenfalls geringe Mengen dieses Zytokins freisetzen können (Gervassi et al. 2004). Die Induktion der IFN-γ-Sekretion von Th1-Zellen hingegen erfolgt durch viele Faktoren, wie u.a. IL-12, IL-18, IL-27 und Stat4 (Murphy and Stockinger 2010), (Paunovic et al. 2008), (Szabo et al. 2003). Das von Th1-Zellen sekretierte IFN-γ ist dann in der Lage, den B-Zell-Klassenwechsel hin zu IgG2a (bzw. IgG2c in C57BL/6), IgG2b und IgG3 einzuleiten (Snapper and Paul 1987), (Snapper et al. 1992). Dieses Antikörperprofil deutet auf eine ausgeprägte ADCC und/oder CDC hin (Nimmerjahn and Ravetch 2006), (Neuberger and Rajewsky 1981). Die ADCC setzt das Vorhandensein chlamydialer Antigene auf der Plasmamembran infizierter Zellen voraus, die dann

wiederum von Chlamydien-spezifischen Antikörpern erkannt werden können. Da bis heute keine Studien über die Exposition chlamydialer Antigene auf der Plasmamembran infizierter Zellen vorliegen und auch durch die hier durchgeführten Experimente keine chlamydialen Antigene auf der Plasmamembran infizierter Epithelzellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 4-47 D), ist davon auszugehen, dass ADDC vermutlich keine (wesentliche) Rolle in der anti-chlamydialen Immunantwort spielt. Die identifizierten IgG-Isotypen waren in der Lage, chlamydiale EBs zu binden, was zu einer Neutralisierung und letztlich einer, um 50 % reduzierten Infektionsrate führte (Abb. 4-49). Diese EB-Antikörper-Komplexe könnten zudem durch das Komplementsystem erkannt und die gebundenen Chlamydien mittels CDC attackiert werden (Bode et al. 2012).

Abschließend lässt sich für diesen Teil der Arbeit zusammenfassen, dass die von NK-Zellen freigesetzten nicht-infektiösen EBs offensichtlich die Fähigkeit besitzen, als Art "Eigenvakzine", eine Th1-basierte Immunantwort auszulösen, bei der anti-chlamydiale IgGs mit neutralisierender Wirkung generiert werden. Die hier gezeigten experimentellen Beobachtungen bieten eine erste wichtige Grundlage für weiterführende immunologische Studien, die die genauen Mechanismen und molekularen Details, der durch „NK-Zell-Chlamydien“ ausgelösten Immunreaktion, charakterisieren. Eine umfassende und tiefere Analyse der zellulären Abläufe, welche die Freisetzung lytischer Granula von infizierten NK-Zellen regulieren, wird entscheidend zum Verständnis des immuntherapeutischen Potentials der NK-Zellen bei Chlamydieninfektionen und möglicherweise auch anderen Infektionen beitragen.

5.4 Postulierte Arbeitsmodelle

Basierend auf den ermittelten Ergebnissen dieser Promotionsarbeit können drei Arbeitsmodelle postuliert werden. Für die mito-xenophagosomale Degradation chlamydialer Strukturen in DCs wurde das in Abb. 5-1 abgebildete Modell erstellt. Chlamydien umgeben ihre Vakuole mit einem Netzwerk aus Zytoskelettfilamenten (wie MTs), um ihr pathogenes Kompartiment strukturell zu stabilisieren. DCs verwenden HDAC6, um dieses stabilisierende MT-Gerüst aufzubrechen und dadurch die Zerstörung bakterieller Vakuolen zu fördern. Dies wird begleitet von einer TNF- α -vermittelten Induktion und Phosphoaktivierung von cPLA2. Aktivierte cPLA2 wiederum produziert Arachidonsäure, welche die chlamydialen Inklusionen weiter destabilisiert, indem sie einen Verlust von $\Delta\psi_m$ der assoziierten Mitochondrien induziert (Katz et al. 2001). Der damit einhergehende metabolische Wechsel von der OXPHOS zur aeroben Glykolyse unterbricht die essenzielle Zufuhr von Energie und Nährstoffen zum Erreger. Nach dem strukturellen Zerfall chlamydialer Inklusionen co-aggregieren freigesetzte zytosolische Bakterien mit defekten Mitochondrien, die die HDAC6/HSP25/27/Parkin-Maschinerie rekrutieren. Die mito-aggresomalen Strukturen durchlaufen eine Ubiquitinierung und rekrutieren LC3 über das Adapterprotein p62. Die resultierenden Xenophagosomen fusionieren schließlich mit endo-/lysosomalen Vakuolen, um Amphisomen und Autolysosomen zu bilden, welche die nachfolgende MHC-I-Antigenpräsentation steuern (Fiegl et al. 2013).

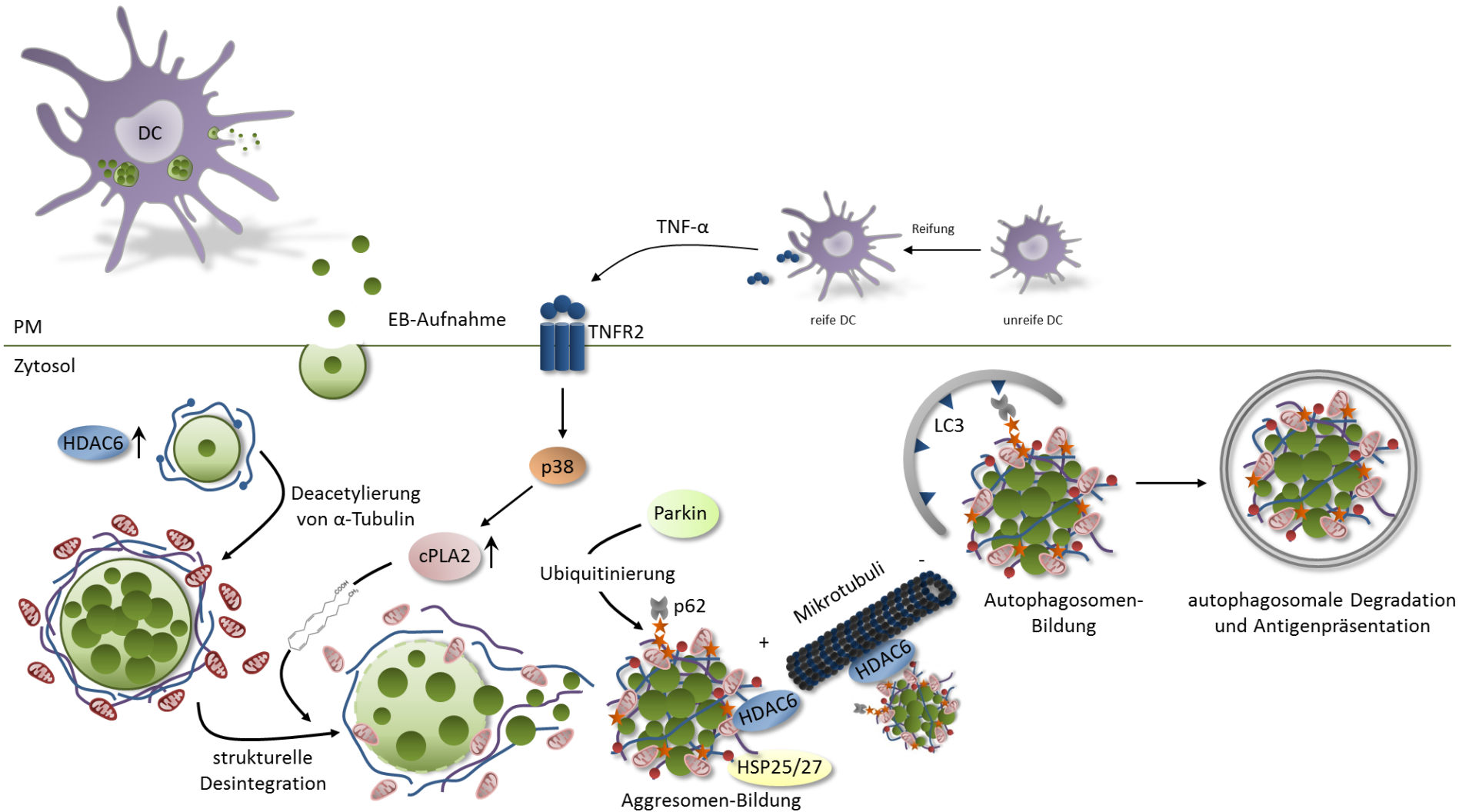


Abb. 5-1 Postuliertes Arbeitsmodell zur mito-xenophagosomalen Degradation chlamydialer Strukturen in infizierten DCs

Während des Infektionsverlaufs von DCs kommt es parallel zur Auto-/Xenophagie zu einer vermehrten Bildung von MVBs und einer daran gekoppelten Formation exosomaler Membranvesikel (iDexosomen). Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen über die Rolle von iDexosomen während der Chlamydieninfektion kann das in Abb. 5-2 dargestellte Arbeitsmodell abgeleitet werden: Die von Chlamydien-infizierten DCs massiv freigesetzten Exosomen (iDEX) exprimieren u.a. den Fas-Liganden (FasL) und transmembrangebundenes TNF- α (TM-TNF). Durch Interaktion von FasL mit seinem entsprechenden Rezeptor (Fas), können iDEX in nicht-infizierten Epithelzellen möglicherweise direkt Apoptose induzieren. Zudem führen sie durch die Interaktion von TM-TNF mit dem entsprechenden Rezeptor (TNFR) auf NK-Zellen zu einer massiven IFN- γ -Sekretion (Renoux et al. 2011). Dieses Zytokin ist dann in der Lage den apoptotischen Effekt von TNF- α (von infizierten DCs sezerniert), auf nicht-infizierte Epithelzellen, synergistisch zu erhöhen. Durch die kombinatorische Wirkung der beiden Zytokine kann außerdem die chlamydiale Subversion der Apoptose infizierter Zellen zu einem gewissen Teil „ausgehebelt“ werden. Folglich tragen iDexosomen maßgeblich zur Eindämmung der Infektionsausbreitung während einer Chlamydieninfektion bei.

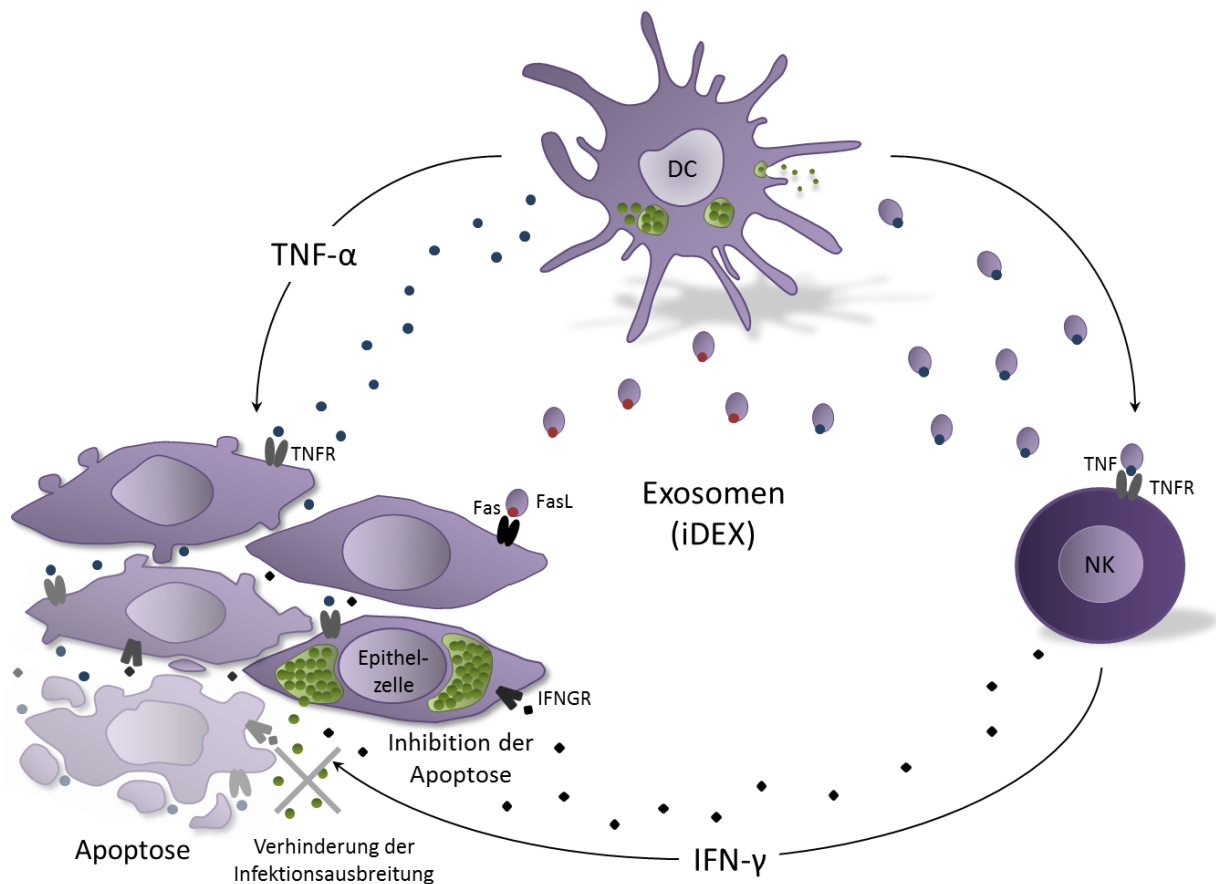


Abb. 5-2 Postuliertes Arbeitsmodell zur Rolle von iDexosomen während der Chlamydieninfektion

Abschließend lässt sich für die anti-chlamydiale Abwehr von NK-Zellen folgendes Modell postulieren (Abb. 5-3): Nach dem Eintritt der Chlamydien in NK-Zellen kommt es zu keinem Zeitpunkt zu einer erfolgreichen Etablierung einer PV und zu keiner EB-RB-Differenzierung. Außerdem bleibt der Transport der Chlamydien zum MTOC/GA aus. Die Infektion geht mit einer Aktivierung der NK-Zellen einher, die sich durch eine erhöhte IFN- γ -Sekretion, CD146-Induktion, PKC- θ -Aktivierung und Degranulierung äußert. Die in ihrer Entwicklung stagnierenden Chlamydien fusionieren mit COPI-positiven lytischen Granula. In diesen werden die chlamydialen Proteine zunächst mithilfe von Granzym-B und ggf. weiteren Enzymen degradiert und schließlich mittels Degranulierung in einer nicht-infektiösen Form (als eine Art „Eigenvakzine“) wieder freigesetzt. Die ausgeschleusten nicht-infektiösen EBs lösen eine Th1-basierte Immunantwort in C57BL/6-Mäusen aus, bei der anti-chlamydiale IgGs mit neutralisierender Wirkung generiert werden. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass die EB-Antikörper-Komplexe mittels CDC attackiert werden.

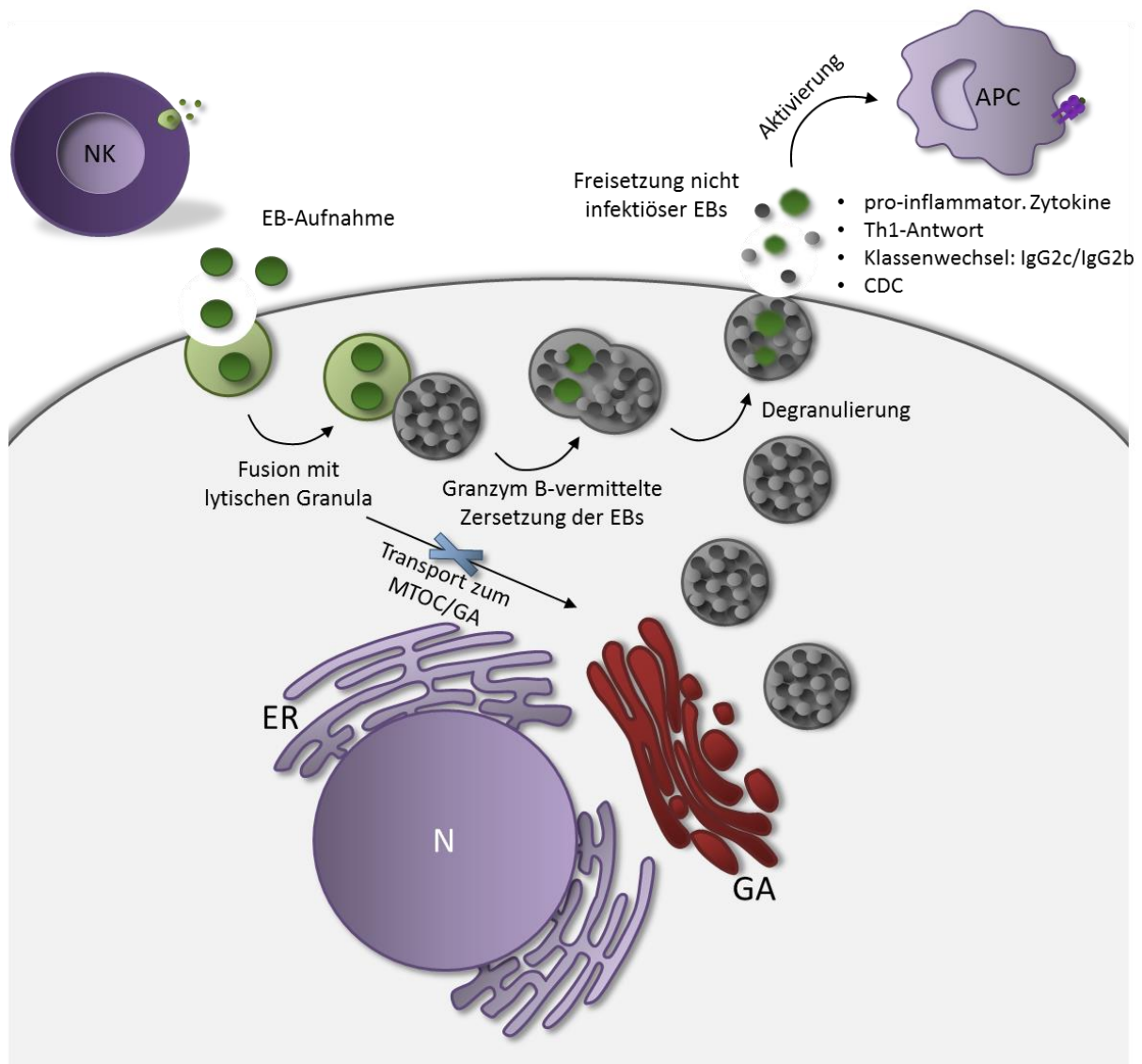


Abb. 5-3 Postuliertes Arbeitsmodell zur anti-chlamydialen Abwehr von NK-Zellen und der durch die freigesetzte „Eigenvakzine“ ausgelösten Immunantwort

5.5 Ausblick für weiterführende Studien

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene molekular- und zellbiologische Fragen zur zellautonomen Abwehr chlamydialer Infektionen von DCs und NK-Zellen geklärt werden. Dabei zeigte sich, dass sich DCs und NK-Zellen sehr unterschiedlicher Mechanismen bedienen, um einer zellulären Chlamydieninfektion entgegenzuwirken. Während in DCs die bakteriellen Inklusionen mittels mitoxenophagosomaler Abbauprozesse degradiert und die daraus resultierenden Abbauprodukte einer MHCII-vermittelten Antigenprozessierung zugeführt werden, zeigen NK-Zellen eine anti-chlamydale Abwehrreaktion bei der eine Inklusionsbildung erst gar nicht zugelassen wird. Stattdessen fusionieren die aufgenommenen Bakterien mit membranumhüllten Granula und werden schließlich von den NK-Zellen mittels Exozytose als nicht-infektiöse Form wieder ausschleust. Es scheint, dass in beiden Zelltypen des angeborenen Immunsystems relativ frühzeitig nach dem Eindringen der Chlamydien über das intrazelluläre Schicksal der Bakterien entschieden wird. Im Falle der infizierten DCs können sich zwar nach der zellulären Aufnahme detektierbare Chlamydienvakuolen bilden. Diese zeigen jedoch im Gegensatz zu infizierten Epithelzellen keinen peri-nukleären Transport zum Golgi-Apparat. Von großer Bedeutung wären daher weiterführende Studien, die die in dieser Arbeit beobachtete Einflussnahme von HDAC6 (bzw. acetylierten stabilen Mikrotubuli) auf die Lokalisierung und das Wachstum der Inklusionen sowie die Reifung der Chlamydien näher analysieren. Insbesondere wären Experimente von großem Interesse, die sich auf die Expression chlamydialer Polypeptide während des eingeschränkten Entwicklungszyklus in DCs konzentrieren und die Interaktionen zwischen Wirtszell- und Chlamydien-Proteinen im Vergleich zur Situation infizierter Epithelzellen näher beleuchten. Für die funktionale Antigenpräsentation in DCs konnte in dieser Arbeit die Beteiligung der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin-1 sowie die Erkennung ubiquitinerter Chlamydien durch p62/SQSTM-1 nachgewiesen werden. Neben Parkin-1 scheint auch eine weitere E3-Ubiquitin-Ligase (LRSAM1) sowie der Autophagierezeptor NDP52 für die xenophagosomale Eliminierung bakterieller Pathogene verantwortlich zu sein (Celli 2012). So konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass LRSAM1 das Zytoplasma vor invasiven Mikroben schützt, indem es Strukturen intrazellulärer Bakterien mittels Ubiquitin und in Kooperation mit NDP52 für den xenophagosomalen Abbau markiert (Celli 2012). Es wäre daher von großem Interesse zu untersuchen, ob diese beiden zellulären Proteine auch eine funktionale Rolle bei der zellautonomen Abwehr gegen Chlamydien spielen. Die Exosomen-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen durch infizierte DCs geht mit einer massiven Sekretion von IFN- γ einher. Die Analysen dieser Arbeit zeigen das Vorhandensein von MHCII-Molekülen in den Exosomen infizierter DCs. Möglicherweise sind diese mit chlamydialen Peptiden beladen und spielen eine funktionale Rolle bei der Aktivierung und IFN- γ -Sekretion Chlamydien-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Entsprechende exosomale Co-Kultivierungsassays

könnten hierüber Aufschluss geben. Da auch andere Antigen-präsentierende Immunzellen (wie z.B. Makrophagen) Exosomen produzieren (Wang et al. 2015), wäre es wichtig zu sehen, ob und in welchem Maße diese extrazellulären Membranvesikel nach entsprechender zellulärer Chlamydieninfektion Einfluss auf NK- und T-Zellen sowie deren IFN- γ -Produktion nehmen. Im Falle der NK-Zellen wäre es zudem von besonderem Interesse die zellulären Mechanismen und Faktoren zu identifizieren, welche eine Inklusionsbildung der Chlamydien verhindern und stattdessen in NK-Zellen eine Fusion mit exozytotischen Granula fördern. Da die von NK-Zellen ausgeschleusten nicht-infektiösen Chlamydien zudem eine nachweisbare Immunogenität besitzen, die zu einer Th1-Antwort führt und die Fähigkeit zur Neutralisierung zellulärer Infektionen besitzt, wäre es wichtig in nachfolgenden Studien die Immunprotektion dieser durch NK-Zellen generierten "bakteriellen Eigenvakzine" mittels chlamydialer Infektions- und Reinfektionversuche in entsprechenden C57BL/6-Mausmodellen zu untersuchen. So könnte ein möglicher therapeutischer Nutzen für die weitere Entwicklung zukünftiger Therapieansätze experimentell überprüft werden. Diese Experimente ließen sich möglicherweise auch auf weitere intrazelluläre Bakterienpathogene (wie z.B. Coxiellen und Rickettsien) ausdehnen.

Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, Y. M., and R. J. Belland. 2005. "The chlamydial developmental cycle." *FEMS Microbiol Rev* 29 (5):949-59. doi: 10.1016/j.femsre.2005.03.002.
- Abrami, L., L. Brandi, M. Moayeri, M. J. Brown, B. A. Krantz, S. H. Leppla, and F. G. van der Goot. 2013. "Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin." *Cell Rep* 5 (4):986-96. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.019.
- Abusamra, A. J., Z. Zhong, X. Zheng, M. Li, T. E. Ichim, J. L. Chin, and W. P. Min. 2005. "Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis." *Blood Cells Mol Dis* 35 (2):169-73. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.07.001.
- Admyre, C., S. M. Johansson, S. Paulie, and S. Gabrielsson. 2006. "Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT." *Eur J Immunol* 36 (7):1772-81. doi: 10.1002/eji.200535615.
- Aguilo, J. I., J. Garaude, J. Pardo, M. Villalba, and A. Anel. 2009. "Protein kinase C-theta is required for NK cell activation and in vivo control of tumor progression." *J Immunol* 182 (4):1972-81. doi: 10.4049/jimmunol.0801820.
- Ahmed, R., and D. Gray. 1996. "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." *Science* 272 (5258):54-60.
- Al-Younes, H. M., M. A. Al-Zeer, H. Khalil, J. Gussmann, A. Karlas, N. Machuy, V. Brinkmann, P. R. Braun, and T. F. Meyer. 2011. "Autophagy-independent function of MAP-LC3 during intracellular propagation of *Chlamydia trachomatis*." *Autophagy* 7 (8):814-28.
- Al-Zeer, M. A., H. M. Al-Younes, M. Kerr, M. Abu-Lubad, E. Gonzalez, V. Brinkmann, and T. F. Meyer. 2014. "Chlamydia trachomatis remodels stable microtubules to coordinate Golgi stack recruitment to the chlamydial inclusion surface." *Mol Microbiol* 94 (6):1285-97. doi: 10.1111/mmi.12829.
- Al-Zeer, M. A., H. M. Al-Younes, D. Lauster, M. Abu Lubad, and T. F. Meyer. 2013. "Autophagy restricts *Chlamydia trachomatis* growth in human macrophages via IFNG-inducible guanylate binding proteins." *Autophagy* 9 (1):50-62. doi: 10.4161/auto.22482.
- Almishri, W., T. Santodomingo-Garzon, T. Le, D. Stack, C. H. Mody, and M. G. Swain. 2016. "TNFalpha Augments Cytokine-Induced NK Cell IFNgamma Production through TNFR2." *J Innate Immun* 8 (6):617-629. doi: 10.1159/000448077.
- Alvarez, S., and M. A. Munoz-Fernandez. 2013. "TNF-Alpha may mediate inflammasome activation in the absence of bacterial infection in more than one way." *PLoS One* 8 (8):e71477. doi: 10.1371/journal.pone.0071477.
- Andersen, A. A. 1997. "Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds." *J Vet Diagn Invest* 9 (2):159-64. doi: 10.1177/104063879700900209.
- Andreola, G., L. Rivoltini, C. Castelli, V. Huber, P. Perego, P. Deho, P. Squarcina, P. Accornero, F. Lozupone, L. Lugini, A. Stringaro, A. Molinari, G. Arancia, M. Gentile, G. Parmiani, and S. Fais. 2002. "Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles." *J Exp Med* 195 (10):1303-16.
- Anel, A., J. I. Aguilo, E. Catalan, J. Garaude, M. G. Rathore, J. Pardo, and M. Villalba. 2012. "Protein Kinase C-theta (PKC-theta) in Natural Killer Cell Function and Anti-Tumor Immunity." *Front Immunol* 3:187. doi: 10.3389/fimmu.2012.00187.
- Arpin, C., J. Dechanet, C. Van Kooten, P. Merville, G. Grouard, F. Briere, J. Banchereau, and Y. J. Liu. 1995. "Generation of memory B cells and plasma cells in vitro." *Science* 268 (5211):720-2.
- Aung, H. T., K. Schroder, S. R. Himes, K. Brion, W. van Zuylen, A. Trieu, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, D. A. Hume, M. J. Sweet, and T. Ravasi. 2006. "LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression." *FASEB J* 20 (9):1315-27. doi: 10.1096/fj.05-5360com.

- Bach, E. A., M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1997. "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." *Annu Rev Immunol* 15:563-91. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.563.
- Bachmann, N. L., A. Polkinghorne, and P. Timms. 2014. "Chlamydia genomics: providing novel insights into chlamydial biology." *Trends Microbiol* 22 (8):464-72. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.013.
- Bader, V., P. Ottis, M. Pum, J. P. Huston, and C. Korth. 2012. "Generation, purification, and characterization of cell-invasive DISC1 protein species." *J Vis Exp* (66):e4132. doi: 10.3791/4132.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392 (6673):245-52. doi: 10.1038/32588.
- Bang, C., and T. Thum. 2012. "Exosomes: new players in cell-cell communication." *Int J Biochem Cell Biol* 44 (11):2060-4. doi: 10.1016/j.biocel.2012.08.007.
- Barry, M., and R. C. Bleackley. 2002. "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." *Nat Rev Immunol* 2 (6):401-9. doi: 10.1038/nri819.
- Barteneva, N., I. Theodor, E. M. Peterson, and L. M. de la Maza. 1996. "Role of neutrophils in controlling early stages of a Chlamydia trachomatis infection." *Infect Immun* 64 (11):4830-3.
- Bastidas, R. J., C. A. Elwell, J. N. Engel, and R. H. Valdivia. 2013. "Chlamydial intracellular survival strategies." *Cold Spring Harb Perspect Med* 3 (5):a010256. doi: 10.1101/cshperspect.a010256.
- Beatty, W. L., T. A. Belanger, A. A. Desai, R. P. Morrison, and G. I. Byrne. 1994. "Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence." *Infect Immun* 62 (9):3705-11.
- Beatty, W. L., R. P. Morrison, and G. I. Byrne. 1994. "Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis." *Microbiol Rev* 58 (4):686-99.
- Beckmann, K. M., N. Borel, A. M. Pocknell, M. P. Dagleish, K. Sachse, S. K. John, A. Pospischil, A. A. Cunningham, and B. Lawson. 2014. "Chlamydiosis in British Garden Birds (2005-2011): retrospective diagnosis and Chlamydia psittaci genotype determination." *Ecohealth* 11 (4):544-63. doi: 10.1007/s10393-014-0951-x.
- Bedson, S. and Bland, J. 1932. "A morphological study of psittacosis virus, with the description of a developmental cycle." *British journal of experimental pathology* 13 (5).
- Beeckman, D. S., and D. C. Vanrompay. 2009. "Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective." *Clin Microbiol Infect* 15 (1):11-7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02669.x.
- Belardelli, F. 1995. "Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response." *APMIS* 103 (3):161-79.
- Bell, J. K., G. E. Mullen, C. A. Leifer, A. Mazzoni, D. R. Davies, and D. M. Segal. 2003. "Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors." *Trends Immunol* 24 (10):528-33.
- Bento, C. F., M. Renna, G. Ghislat, C. Puri, A. Ashkenazi, M. Vicinanza, F. M. Menzies, and D. C. Rubinsztein. 2016. "Mammalian Autophagy: How Does It Work?" *Annu Rev Biochem* 85:685-713. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014556.
- Berard, F., P. Blanco, J. Davoust, E. M. Neidhart-Berard, M. Nouri-Shirazi, N. Taquet, D. Rimoldi, J. C. Cerottini, J. Banchereau, and A. K. Palucka. 2000. "Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells." *J Exp Med* 192 (11):1535-44.
- Berges, C., C. Naujokat, S. Tinapp, H. Wieczorek, A. Hoh, M. Sadeghi, G. Opelz, and V. Daniel. 2005. "A cell line model for the differentiation of human dendritic cells." *Biochem Biophys Res Commun* 333 (3):896-907. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.171.
- Beron, W., L. S. Mayorga, M. I. Colombo, and P. D. Stahl. 2001. "Recruitment of coat-protein-complex proteins on to phagosomal membranes is regulated by a brefeldin A-sensitive ADP-ribosylation factor." *Biochem J* 355 (Pt 2):409-15.

- Bhatnagar, S., K. Shinagawa, F. J. Castellino, and J. S. Schorey. 2007. "Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo." *Blood* 110 (9):3234-44. doi: 10.1182/blood-2007-03-079152.
- Bianchi, M. E. 2007. "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* 81 (1):1-5. doi: 10.1189/jlb.0306164.
- Billiau, A., and P. Matthys. 2009. "Interferon-gamma: a historical perspective." *Cytokine Growth Factor Rev* 20 (2):97-113. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.02.004.
- Bin-Umer, M. A., J. E. McLaughlin, M. S. Butterly, S. McCormick, and N. E. Tumer. 2014. "Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (32):11798-803. doi: 10.1073/pnas.1403145111.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather. 1999. "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." *Annu Rev Immunol* 17:189-220. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.189.
- Bjorkoy, G., T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark, and T. Johansen. 2005. "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death." *J Cell Biol* 171 (4):603-14. doi: 10.1083/jcb.200507002.
- Blanchard, N., D. Lankar, F. Faure, A. Regnault, C. Dumont, G. Raposo, and C. Hivroz. 2002. "TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex." *J Immunol* 168 (7):3235-41.
- Blanchet, F. P., A. Moris, D. S. Nikolic, M. Lehmann, S. Cardinaud, R. Stalder, E. Garcia, C. Dinkins, F. Leuba, L. Wu, O. Schwartz, V. Deretic, and V. Piguet. 2010. "Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses." *Immunity* 32 (5):654-69. doi: 10.1016/j.immuni.2010.04.011.
- Blasi, F., P. Tarsia, and S. Aliberti. 2009. "Chlamydia pneumoniae." *Clin Microbiol Infect* 15 (1):29-35. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02130.x.
- Blees, A., D. Janulienė, T. Hofmann, N. Koller, C. Schmidt, S. Trowitzsch, A. Moeller, and R. Tampe. 2017. "Structure of the human MHC-I peptide-loading complex." *Nature* 551 (7681):525-528. doi: 10.1038/nature24627.
- Bode, J., P. Dutow, K. Sommer, K. Janik, S. Glage, B. Tummler, A. Munder, R. Laudeley, K. W. Sachse, and A. Klos. 2012. "A new role of the complement system: C3 provides protection in a mouse model of lung infection with intracellular Chlamydia psittaci." *PLoS One* 7 (11):e50327. doi: 10.1371/journal.pone.0050327.
- Bode, L., S. Murch, and H. H. Freeze. 2006. "Heparan sulfate plays a central role in a dynamic in vitro model of protein-losing enteropathy." *J Biol Chem* 281 (12):7809-15. doi: 10.1074/jbc.M510722200.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach. 2000. "Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity." *Curr Opin Immunol* 12 (1):64-76.
- Bolhuis, S., and C. Richter-Landsberg. 2010. "Effect of proteasome inhibition by MG-132 on HSP27 oligomerization, phosphorylation, and aggresome formation in the OLN-93 oligodendroglia cell line." *J Neurochem* 114 (4):960-71. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06600.x.
- Bonilla, F. A., and H. C. Oettgen. 2010. "Adaptive immunity." *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2):S33-40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017.
- Borel, N., C. Leonard, J. Slade, and R. V. Schoborg. 2016. "Chlamydial Antibiotic Resistance and Treatment Failure in Veterinary and Human Medicine." *Curr Clin Microbiol Rep* 3:10-18. doi: 10.1007/s40588-016-0028-4.
- Bouvier, M., and D. C. Wiley. 1994. "Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules." *Science* 265 (5170):398-402.
- Boyault, C., Y. Zhang, S. Fritah, C. Caron, B. Gilquin, S. H. Kwon, C. Garrido, T. P. Yao, C. Vourc'h, P. Matthias, and S. Khochbin. 2007. "HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates." *Genes Dev* 21 (17):2172-81. doi: 10.1101/gad.436407.

- Braukmann, M., K. Sachse, I. D. Jacobsen, M. Westermann, C. Menge, H. P. Saluz, and A. Berndt. 2012. "Distinct intensity of host-pathogen interactions in *Chlamydia psittaci*- and *Chlamydia abortus*-infected chicken embryos." *Infect Immun* 80 (9):2976-88. doi: 10.1128/IAI.00437-12.
- Brunham, R. C., and J. Rey-Ladino. 2005. "Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine." *Nat Rev Immunol* 5 (2):149-61. doi: 10.1038/nri1551.
- Byrne, G. I., L. K. Lehmann, and G. J. Landry. 1986. "Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells." *Infect Immun* 53 (2):347-51.
- Byrne, G. I., and D. M. Ojcius. 2004. "Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen." *Nat Rev Microbiol* 2 (10):802-8. doi: 10.1038/nrmicro1007.
- Callis, J. 2014. "The ubiquitination machinery of the ubiquitin system." *Arabidopsis Book* 12:e0174. doi: 10.1199/tab.0174.
- Cambray-Deakin, M. A., and R. D. Burgoyne. 1987. "Acetylated and detyrosinated alpha-tubulins are co-localized in stable microtubules in rat meningeal fibroblasts." *Cell Motil Cytoskeleton* 8 (3):284-91. doi: 10.1002/cm.970080309.
- Campbell, L. A., and C. C. Kuo. 2004. "Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis?" *Nat Rev Microbiol* 2 (1):23-32. doi: 10.1038/nrmicro796.
- Campbell, S., S. J. Richmond, P. S. Yates, and C. C. Storey. 1994. "Lipopolysaccharide in cells infected by *Chlamydia trachomatis*." *Microbiology* 140 (Pt 8):1995-2002. doi: 10.1099/13500872-140-8-1995.
- Cao, Z. H., Q. Y. Zheng, G. Q. Li, X. B. Hu, S. L. Feng, G. L. Xu, and K. Q. Zhang. 2015. "STAT1-mediated down-regulation of Bcl-2 expression is involved in IFN-gamma/TNF-alpha-induced apoptosis in NIT-1 cells." *PLoS One* 10 (3):e0120921. doi: 10.1371/journal.pone.0120921.
- Carabeo, R. A., S. S. Grieshaber, E. Fischer, and T. Hackstadt. 2002. "Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells." *Infect Immun* 70 (7):3793-803.
- CDC. 2000. "Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis)." *Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep* 49:3-17.
- Celli, J. 2012. "LRSAM1, an E3 Ubiquitin ligase with a sense for bacteria." *Cell Host Microbe* 12 (6):735-6. doi: 10.1016/j.chom.2012.11.007.
- Chambers, C. A., and J. P. Allison. 1997. "Co-stimulation in T cell responses." *Curr Opin Immunol* 9 (3):396-404.
- Chaput, N., C. Flament, S. Viaud, J. Taieb, S. Roux, A. Spatz, F. Andre, J. B. LePecq, M. Boussac, J. Garin, S. Amigorena, C. Thery, and L. Zitvogel. 2006. "Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations." *J Leukoc Biol* 80 (3):471-8. doi: 10.1189/jlb.0206094.
- Chemali, M., K. Radtke, M. Desjardins, and L. English. 2011. "Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy." *Cell Mol Life Sci* 68 (9):1533-41. doi: 10.1007/s00018-011-0660-3.
- Chen, J. C., and R. S. Stephens. 1994. "Trachoma and LGV biovars of *Chlamydia trachomatis* share the same glycosaminoglycan-dependent mechanism for infection of eukaryotic cells." *Mol Microbiol* 11 (3):501-7.
- Chen, L., L. Lei, Z. Zhou, J. He, S. Xu, C. Lu, J. Chen, Z. Yang, G. Wu, I. T. Yeh, G. Zhong, and Y. Wu. 2013. "Contribution of interleukin-12 p35 (IL-12p35) and IL-12p40 to protective immunity and pathology in mice infected with *Chlamydia muridarum*." *Infect Immun* 81 (8):2962-71. doi: 10.1128/IAI.00161-13.
- Chougnet, C. A., R. I. Thacker, H. M. Shehata, C. M. Hennies, M. A. Lehn, C. S. Lages, and E. M. Janssen. 2015. "Loss of Phagocytic and Antigen Cross-Presenting Capacity in Aging Dendritic Cells Is Associated with Mitochondrial Dysfunction." *J Immunol* 195 (6):2624-32. doi: 10.4049/jimmunol.1501006.
- Clayton, A., J. P. Mitchell, J. Court, S. Linnane, M. D. Mason, and Z. Tabi. 2008. "Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression." *J Immunol* 180 (11):7249-58.

- Clifton, D. R., K. A. Fields, S. S. Grieshaber, C. A. Dooley, E. R. Fischer, D. J. Mead, R. A. Carabeo, and T. Hackstadt. 2004. "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (27):10166-71. doi: 10.1073/pnas.0402829101.
- Colonna, M., G. Trinchieri, and Y. J. Liu. 2004. "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." *Nat Immunol* 5 (12):1219-26. doi: 10.1038/ni1141.
- Constant, S. L., and K. Bottomly. 1997. "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." *Annu Rev Immunol* 15:297-322. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.297.
- Coonrod, J. D., R. L. Lester, and L. C. Hsu. 1984. "Characterization of the extracellular bactericidal factors of rat alveolar lining material." *J Clin Invest* 74 (4):1269-79. doi: 10.1172/JCI111537.
- Cooper, M. A., M. Colonna, and W. M. Yokoyama. 2009. "Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity." *EMBO Rep* 10 (10):1103-10. doi: 10.1038/embor.2009.203.
- Cooper, M. D., and M. N. Alder. 2006. "The evolution of adaptive immune systems." *Cell* 124 (4):815-22. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.001.
- Covelli, H. D., D. L. Husky, and R. E. Dolphin. 1980. "Psittacosis: clinical presentation and therapeutic observations." *West J Med* 132 (3):242-5.
- Cresswell, P., N. Bangia, T. Dick, and G. Diedrich. 1999. "The nature of the MHC class I peptide loading complex." *Immunol Rev* 172:21-8.
- Crosse, B. A. 1990. "Psittacosis: a clinical review." *J Infect* 21 (3):251-9.
- Crotzer, V. L., and J. S. Blum. 2009. "Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation." *J Immunol* 182 (6):3335-41. doi: 10.4049/jimmunol.0803458.
- Cruz, F. M., J. D. Colbert, E. Merino, B. A. Kriegsmann, and K. L. Rock. 2017. "The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules." *Annu Rev Immunol* 35:149-176. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055254.
- Cuervo, A. M., E. Bergamini, U. T. Brunk, W. Droge, M. Ffrench, and A. Terman. 2005. "Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells." *Autophagy* 1 (3):131-40.
- Cuervo, A. M., and F. Macian. 2012. "Autophagy, nutrition and immunology." *Mol Aspects Med* 33 (1):2-13. doi: 10.1016/j.mam.2011.09.001.
- Cyster, J. G. 1999. "Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs." *J Exp Med* 189 (3):447-50.
- Damiani, M. T., J. Gambarte Tudela, and A. Capmany. 2014. "Targeting eukaryotic Rab proteins: a smart strategy for chlamydial survival and replication." *Cell Microbiol* 16 (9):1329-38. doi: 10.1111/cmi.12325.
- Darville, T., C. W. Andrews, Jr., and R. G. Rank. 2000. "Does inhibition of tumor necrosis factor alpha affect chlamydial genital tract infection in mice and guinea pigs?" *Infect Immun* 68 (9):5299-305.
- Das. 2018. "Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: A review." *Journal of Advanced Research* In Press, Corrected Proof.
- Das, M., S. V. Kaveri, and J. Bayry. 2015. "Cross-presentation of antigens by dendritic cells: role of autophagy." *Oncotarget* 6 (30):28527-8. doi: 10.18632/oncotarget.5268.
- Datta, B., F. Njau, J. Thalmann, H. Haller, and A. D. Wagner. 2014. "Differential infection outcome of Chlamydia trachomatis in human blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells." *BMC Microbiol* 14:209. doi: 10.1186/s12866-014-0209-3.
- Dautry-Varsat, A., A. Subtil, and T. Hackstadt. 2005. "Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry." *Cell Microbiol* 7 (12):1714-22. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00627.x.
- Davis, M. M., and P. J. Bjorkman. 1988. "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." *Nature* 334 (6181):395-402. doi: 10.1038/334395a0.
- Davis, M. T., and D. F. Silbert. 1974. "Changes in cell permeability following a marked reduction of saturated fatty acid content of Escherichia coli K-12." *Biochim Biophys Acta* 373 (2):224-41.

- De Luca, A., R. G. Iannitti, S. Bozza, R. Beau, A. Casagrande, C. D'Angelo, S. Moretti, C. Cunha, G. Giovannini, C. Massi-Benedetti, A. Carvalho, L. Boon, J. P. Latge, and L. Romani. 2012. "CD4(+) T cell vaccination overcomes defective cross-presentation of fungal antigens in a mouse model of chronic granulomatous disease." *J Clin Invest* 122 (5):1816-31. doi: 10.1172/JCI60862.
- de Vrieze, N. H., and H. J. de Vries. 2014. "Lymphogranuloma venereum among men who have sex with men. An epidemiological and clinical review." *Expert Rev Anti Infect Ther* 12 (6):697-704. doi: 10.1586/14787210.2014.901169.
- Delgado, M. A., and V. Deretic. 2009. "Toll-like receptors in control of immunological autophagy." *Cell Death Differ* 16 (7):976-83. doi: 10.1038/cdd.2009.40.
- Dennis, E. A., J. Cao, Y. H. Hsu, V. Magrioti, and G. Kokotos. 2011. "Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention." *Chem Rev* 111 (10):6130-85. doi: 10.1021/cr200085w.
- Deretic, V. 2010. "Autophagy in infection." *Curr Opin Cell Biol* 22 (2):252-62. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.009.
- Derre, I., M. Pypaert, A. Dautry-Varsat, and H. Agaisse. 2007. "RNAi screen in Drosophila cells reveals the involvement of the Tom complex in Chlamydia infection." *PLoS Pathog* 3 (10):1446-58. doi: 10.1371/journal.ppat.0030155.
- Desbois, A. P., and V. J. Smith. 2010. "Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential." *Appl Microbiol Biotechnol* 85 (6):1629-42. doi: 10.1007/s00253-009-2355-3.
- Despoix, N., T. Walzer, N. Jouve, M. Blot-Chabaud, N. Bardin, P. Paul, L. Lyonnet, E. Vivier, F. Dignat-George, and F. Vely. 2008. "Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation." *Eur J Immunol* 38 (10):2855-64. doi: 10.1002/eji.200838469.
- Di Paola, M., and M. Lorusso. 2006. "Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition." *Biochim Biophys Acta* 1757 (9-10):1330-7. doi: 10.1016/j.bbabo.2006.03.024.
- Di Paola, M., P. Zaccagnino, C. Oliveros-Celis, and M. Lorusso. 2006. "Arachidonic acid induces specific membrane permeability increase in heart mitochondria." *FEBS Lett* 580 (3):775-81. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.090.
- Ding, G., H. D. Liu, Q. Huang, H. X. Liang, Z. H. Ding, Z. J. Liao, and G. Huang. 2013. "HDAC6 promotes hepatocellular carcinoma progression by inhibiting P53 transcriptional activity." *FEBS Lett* 587 (7):880-6. doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.001.
- Dotiwala, F., S. Sen Santara, A. A. Binker-Cosen, B. Li, S. Chandrasekaran, and J. Lieberman. 2017. "Granzyme B Disrupts Central Metabolism and Protein Synthesis in Bacteria to Promote an Immune Cell Death Program." *Cell* 171 (5):1125-1137 e11. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.004.
- Drexler, H. G., and C. C. Uphoff. 2002. "Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention." *Cytotechnology* 39 (2):75-90. doi: 10.1023/A:1022913015916.
- Duan, L., H. Gan, J. Arm, and H. G. Remold. 2001. "Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF-alpha in the induction of apoptosis of human macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis H37Ra." *J Immunol* 166 (12):7469-76.
- Dutow, P., B. Fehlhaber, J. Bode, R. Laudeley, C. Rheinheimer, S. Glage, R. A. Wetsel, O. Pabst, and A. Klos. 2014. "The complement C3a receptor is critical in defense against Chlamydia psittaci in mouse lung infection and required for antibody and optimal T cell response." *J Infect Dis* 209 (8):1269-78. doi: 10.1093/infdis/jit640.
- Eisenreich, W., J. Heesemann, T. Rudel, and W. Goebel. 2013. "Metabolic host responses to infection by intracellular bacterial pathogens." *Front Cell Infect Microbiol* 3:24. doi: 10.3389/fcimb.2013.00024.
- English, L., M. Chemali, J. Duron, C. Rondeau, A. Laplante, D. Gingras, D. Alexander, D. Leib, C. Norbury, R. Lippe, and M. Desjardins. 2009. "Autophagy enhances the presentation of

- endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection." *Nat Immunol* 10 (5):480-7. doi: 10.1038/ni.1720.
- Escalante-Ochoa, C., R. Ducatelle, G. Charlier, K. De Vos, and F. Haesebrouck. 1999. "Significance of host cell kinesin in the development of *Chlamydia psittaci*." *Infect Immun* 67 (10):5441-6.
- Ettelaie, C., M. E. Collier, N. J. James, and C. Li. 2007. "Induction of tissue factor expression and release as microparticles in ECV304 cell line by *Chlamydia pneumoniae* infection." *Atherosclerosis* 190 (2):343-51. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.005.
- Evans, J. H., A. Horowitz, M. Mehrabi, E. L. Wise, J. E. Pease, E. M. Riley, and D. M. Davis. 2011. "A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG." *Eur J Immunol* 41 (7):1924-33. doi: 10.1002/eji.201041180.
- Everett, K. D., R. M. Bush, and A. A. Andersen. 1999. "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2:415-40. doi: 10.1099/00207713-49-2-415.
- Fadel, S., and A. Eley. 2007. "Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin." *J Med Microbiol* 56 (Pt 1):15-22. doi: 10.1099/jmm.0.46801-0.
- Fader, C. M., and M. I. Colombo. 2009. "Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners." *Cell Death Differ* 16 (1):70-8. doi: 10.1038/cdd.2008.168.
- Fader, C. M., D. Sanchez, M. Furlan, and M. I. Colombo. 2008. "Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells." *Traffic* 9 (2):230-50. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1991. "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules." *Nature* 351 (6324):290-6. doi: 10.1038/351290a0.
- Fan, T., H. Lu, H. Hu, L. Shi, G. A. McClarty, D. M. Nance, A. H. Greenberg, and G. Zhong. 1998. "Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation." *J Exp Med* 187 (4):487-96.
- Fay, J. P., and R. N. Farias. 1977. "Inhibitory action of a non-metabolizable fatty acid on the growth of *Escherichia coli*: role of metabolism and outer membrane integrity." *J Bacteriol* 132 (3):790-5.
- Ferlazzo, G., and B. Morandi. 2014. "Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells." *Front Immunol* 5:159. doi: 10.3389/fimmu.2014.00159.
- Ferreri, A. J., I. Ernberg, and C. Copie-Bergman. 2009. "Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects." *J Intern Med* 265 (4):421-38. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02083.x.
- Ferreri, A. J., M. Guidoboni, M. Ponzoni, C. De Conciliis, S. Dell'Oro, K. Fleischhauer, L. Caggiari, A. A. Lettini, E. Dal Cin, R. Ieri, M. Freschi, E. Villa, M. Boiocchi, and R. Dolcetti. 2004. "Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphomas." *J Natl Cancer Inst* 96 (8):586-94.
- Fiegl, D., D. Kagebein, E. M. Liebler-Tenorio, T. Weisser, M. Sens, M. Gutjahr, and M. R. Knittler. 2013. "Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells." *J Immunol* 190 (6):2791-806. doi: 10.4049/jimmunol.1202741.
- Fields, K. A., R. A. Heinzen, and R. Carabeo. 2011. "The obligate intracellular lifestyle." *Front Microbiol* 2:99. doi: 10.3389/fmicb.2011.00099.
- Finlay, B. B., and P. Cossart. 1997. "Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens." *Science* 276 (5313):718-25.
- Fischer, S. F., T. Harlander, J. Vier, and G. Hacker. 2004. "Protection against CD95-induced apoptosis by chlamydial infection at a mitochondrial step." *Infect Immun* 72 (2):1107-15.

- Fisher, D. J., N. E. Adams, and A. T. Maurelli. 2015. "Phosphoproteomic analysis of the *Chlamydia caviae* elementary body and reticulate body forms." *Microbiology* 161 (8):1648-58. doi: 10.1099/mic.0.000116.
- Fox, J, Barthold, S, Davisson, M, Newcomer, C, Quimby, F, Smith, A. 2006. "The Mouse in Biomedical Research." *Normative Biology, Husbandry, and Models, Academic Press* 3 (2).
- Fratta, P., W. K. Engel, J. McFerrin, K. J. Davies, S. W. Lin, and V. Askanas. 2005. "Proteasome inhibition and aggresome formation in sporadic inclusion-body myositis and in amyloid-beta precursor protein-overexpressing cultured human muscle fibers." *Am J Pathol* 167 (2):517-26.
- Frohlich, K., Z. Hua, J. Wang, and L. Shen. 2012. "Isolation of *Chlamydia trachomatis* and membrane vesicles derived from host and bacteria." *J Microbiol Methods* 91 (2):222-30. doi: 10.1016/j.mimet.2012.08.012.
- Fujita, N., M. Hayashi-Nishino, H. Fukumoto, H. Omori, A. Yamamoto, T. Noda, and T. Yoshimori. 2008. "An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure." *Mol Biol Cell* 19 (11):4651-9. doi: 10.1091/mbc.E08-03-0312.
- Gabriely, G., R. Kama, and J. E. Gerst. 2007. "Involvement of specific COPI subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast." *Mol Cell Biol* 27 (2):526-40. doi: 10.1128/MCB.00577-06.
- Galbraith, H., and T. B. Miller. 1973. "Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts." *J Appl Bacteriol* 36 (4):647-58.
- Gambarte Tudela, J., A. Capmany, M. Romao, C. Quintero, S. Miserey-Lenkei, G. Raposo, B. Goud, and M. T. Damiani. 2015. "The late endocytic Rab39a GTPase regulates the interaction between multivesicular bodies and chlamydial inclusions." *J Cell Sci* 128 (16):3068-81. doi: 10.1242/jcs.170092.
- Geng, J., and D. J. Klionsky. 2010. "The Golgi as a potential membrane source for autophagy." *Autophagy* 6 (7):950-1. doi: 10.4161/auto.6.7.13009.
- Gerard, H. C., J. Freise, Z. Wang, G. Roberts, D. Rudy, B. Krauss-Opatz, L. Kohler, H. Zeidler, H. R. Schumacher, J. A. Whittum-Hudson, and A. P. Hudson. 2002. "*Chlamydia trachomatis* genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs. persistent infection." *Microbes Infect* 4 (1):13-22.
- Gerspach, J., A. Gotz, G. Zimmermann, C. Kolle, H. Bottinger, and M. Grell. 2000. "Detection of membrane-bound tumor necrosis factor (TNF): an analysis of TNF-specific reagents." *Microsc Res Tech* 50 (3):243-50. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<243::AID-JEMT8>3.0.CO;2-B.
- Gervassi, A., M. R. Alderson, R. Suchland, J. F. Maisonneuve, K. H. Grabstein, and P. Probst. 2004. "Differential regulation of inflammatory cytokine secretion by human dendritic cells upon *Chlamydia trachomatis* infection." *Infect Immun* 72 (12):7231-9. doi: 10.1128/IAI.72.12.7231-7239.2004.
- Gleimer, M., and P. Parham. 2003. "Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress." *Immunity* 19 (4):469-77.
- Goellner, S., E. Schubert, E. Liebler-Tenorio, H. Hotzel, H. P. Saluz, and K. Sachse. 2006. "Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different in vitro models of persistent infection." *Infect Immun* 74 (8):4801-8. doi: 10.1128/IAI.01487-05.
- Goldberg, A. L., and K. L. Rock. 1992. "Proteolysis, proteasomes and antigen presentation." *Nature* 357 (6377):375-9. doi: 10.1038/357375a0.
- Greene, W., Y. Xiao, Y. Huang, G. McClarty, and G. Zhong. 2004. "*Chlamydia*-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis." *Infect Immun* 72 (1):451-60.
- Grieshaber, S. S., N. A. Grieshaber, and T. Hackstadt. 2003. "*Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process." *J Cell Sci* 116 (Pt 18):3793-802. doi: 10.1242/jcs.00695.
- Gromme, M., and J. Neefjes. 2002. "Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways." *Mol Immunol* 39 (3-4):181-202.

- Gruenberg, J., and F. G. van der Goot. 2006. "Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (7):495-504. doi: 10.1038/nrm1959.
- Habib, S., A. El Andaloussi, A. Hisham, and N. Ismail. 2016. "NK Cell-Mediated Regulation of Protective Memory Responses against Intracellular Ehrlichial Pathogens." *PLoS One* 11 (4):e0153223. doi: 10.1371/journal.pone.0153223.
- Hackstadt, T., E. R. Fischer, M. A. Scidmore, D. D. Rockey, and R. A. Heinzen. 1997. "Origins and functions of the chlamydial inclusion." *Trends Microbiol* 5 (7):288-93. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01061-5.
- Hackstadt, T., D. D. Rockey, R. A. Heinzen, and M. A. Scidmore. 1996. "Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane." *EMBO J* 15 (5):964-77.
- Hackstadt, T., M. A. Scidmore, and D. D. Rockey. 1995. "Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (11):4877-81.
- Hafner, L. M., D. P. Wilson, and P. Timms. 2014. "Development status and future prospects for a vaccine against Chlamydia trachomatis infection." *Vaccine* 32 (14):1563-71. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.08.020.
- Hailey, D. W., A. S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P. K. Kim, and J. Lippincott-Schwartz. 2010. "Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation." *Cell* 141 (4):656-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.009.
- Haldar, A. K., A. S. Piro, R. Finethy, S. T. Espenschied, H. E. Brown, A. M. Giebel, E. M. Frickel, D. E. Nelson, and J. Coers. 2016. "Chlamydia trachomatis Is Resistant to Inclusion Ubiquitination and Associated Host Defense in Gamma Interferon-Primed Human Epithelial Cells." *MBio* 7 (6). doi: 10.1128/mBio.01417-16.
- Haldar, A. K., A. S. Piro, D. M. Pilla, M. Yamamoto, and J. Coers. 2014. "The E2-like conjugation enzyme Atg3 promotes binding of IRG and Gbp proteins to Chlamydia- and Toxoplasma-containing vacuoles and host resistance." *PLoS One* 9 (1):e86684. doi: 10.1371/journal.pone.0086684.
- Hannafon, B. N., and W. Q. Ding. 2013. "Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer." *Int J Mol Sci* 14 (7):14240-69. doi: 10.3390/ijms140714240.
- Hatam, L., S. Schuval, and V. R. Bonagura. 1994. "Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay." *Cytometry* 16 (1):59-68. doi: 10.1002/cyto.990160109.
- Hayashi-Nishino, M., N. Fujita, T. Noda, A. Yamaguchi, T. Yoshimori, and A. Yamamoto. 2009. "A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation." *Nat Cell Biol* 11 (12):1433-7. doi: 10.1038/ncb1991.
- Heczko, P. B., R. Luttkien, W. Hryniewicz, M. Neugebauer, and G. Pulverer. 1979. "Susceptibility of Staphylococcus aureus and group A, B, C, and G streptococci to free fatty acids." *J Clin Microbiol* 9 (3):333-5.
- Heddema, E. R., E. J. van Hanne, M. Bongaerts, F. Dijkstra, R. J. Ten Hove, B. de Wever, and D. Vanrompay. 2015. "Typing of Chlamydia psittaci to monitor epidemiology of psittacosis and aid disease control in the Netherlands, 2008 to 2013." *Euro Surveill* 20 (5):21026.
- Henning, A. K., M. H. Groschup, T. C. Mettenleiter, and A. Karger. 2014. "Analysis of the bovine plasma proteome by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight tandem mass spectrometry." *Vet J* 199 (1):175-80. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.10.029.
- Heuer, D., A. Rejman Lipinski, N. Machuy, A. Karlas, A. Wehrens, F. Siedler, V. Brinkmann, and T. F. Meyer. 2009. "Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction." *Nature* 457 (7230):731-5. doi: 10.1038/nature07578.
- Hillered, L., and P. H. Chan. 1988. "Effects of arachidonic acid on respiratory activities in isolated brain mitochondria." *J Neurosci Res* 19 (1):94-100. doi: 10.1002/jnr.490190113.
- Hodinka, R. L., C. H. Davis, J. Choong, and P. B. Wyrick. 1988. "Ultrastructural study of endocytosis of Chlamydia trachomatis by McCoy cells." *Infect Immun* 56 (6):1456-63.

- Hogan, R. J., S. A. Mathews, S. Mukhopadhyay, J. T. Summersgill, and P. Timms. 2004. "Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm." *Infect Immun* 72 (4):1843-55.
- Hook, C. E., M. K. Matyszak, and J. S. Gaston. 2005. "Infection of epithelial and dendritic cells by *Chlamydia trachomatis* results in IL-18 and IL-12 production, leading to interferon-gamma production by human natural killer cells." *FEMS Immunol Med Microbiol* 45 (2):113-20. doi: 10.1016/j.femsim.2005.02.010.
- Hook, C. E., N. Telyatnikova, J. C. Goodall, V. M. Braud, A. J. Carmichael, M. R. Wills, and J. S. Gaston. 2004. "Effects of *Chlamydia trachomatis* infection on the expression of natural killer (NK) cell ligands and susceptibility to NK cell lysis." *Clin Exp Immunol* 138 (1):54-60. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02596.x.
- Horn, M. 2008. "Chlamydiae as symbionts in eukaryotes." *Annu Rev Microbiol* 62:113-31. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162818.
- Horowitz, A., K. A. Stegmann, and E. M. Riley. 2011. "Activation of natural killer cells during microbial infections." *Front Immunol* 2:88. doi: 10.3389/fimmu.2011.00088.
- Hu, V. H., M. J. Holland, and M. J. Burton. 2013. "Trachoma: protective and pathogenic ocular immune responses to *Chlamydia trachomatis*." *PLoS Negl Trop Dis* 7 (2):e2020. doi: 10.1371/journal.pntd.0002020.
- Huang, J., and J. H. Brumell. 2014. "Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival." *Nat Rev Microbiol* 12 (2):101-14. doi: 10.1038/nrmicro3160.
- Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X. F. Wang, and T. P. Yao. 2002. "HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase." *Nature* 417 (6887):455-8. doi: 10.1038/417455a.
- Huett, A., R. J. Heath, J. Begun, S. O. Sassi, L. A. Baxt, J. M. Vyas, M. B. Goldberg, and R. J. Xavier. 2012. "The LRR and RING domain protein LRSAM1 is an E3 ligase crucial for ubiquitin-dependent autophagy of intracellular *Salmonella Typhimurium*." *Cell Host Microbe* 12 (6):778-90. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.019.
- Husmann, M., E. Beckmann, K. Boller, N. Kloft, S. Tenzer, W. Bobkiewicz, C. Neukirch, H. Bayley, and S. Bhakdi. 2009. "Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis." *FEBS Lett* 583 (2):337-44. doi: 10.1016/j.febslet.2008.12.028.
- Hybiske, K., and R. S. Stephens. 2007. "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (27):11430-5. doi: 10.1073/pnas.0703218104.
- Igietseme, J. U., F. O. Eko, Q. He, and C. M. Black. 2004. "Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens." *Expert Rev Vaccines* 3 (1):23-34. doi: 10.1586/14760584.3.1.23.
- Igyarto, B. Z., and D. H. Kaplan. 2013. "Antigen presentation by Langerhans cells." *Curr Opin Immunol* 25 (1):115-9. doi: 10.1016/j.coi.2012.11.007.
- Ingram, L. O., L. C. Eaton, G. W. Erdos, T. F. Tedder, and N. L. Vreeland. 1982. "Unsaturated fatty acid requirement in *Escherichia coli*: mechanism of palmitate-induced inhibition of growth of strain WN1." *J Membr Biol* 65 (1-2):31-40.
- Into, T., M. Inomata, E. Takayama, and T. Takigawa. 2012. "Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling." *Cell Signal* 24 (6):1150-62. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.020.
- Ishihama, Y., Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber, and M. Mann. 2005. "Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein." *Mol Cell Proteomics* 4 (9):1265-72. doi: 10.1074/mcp.M500061-MCP200.
- Ito, H., K. Kamei, I. Iwamoto, Y. Inaguma, R. Garcia-Mata, E. Sztul, and K. Kato. 2002. "Inhibition of proteasomes induces accumulation, phosphorylation, and recruitment of HSP27 and alphaB-crystallin to aggresomes." *J Biochem* 131 (4):593-603.
- Iwata, A., B. E. Riley, J. A. Johnston, and R. R. Kopito. 2005. "HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin." *J Biol Chem* 280 (48):40282-92. doi: 10.1074/jbc.M508786200.

- Iwata, J., J. Ezaki, M. Komatsu, S. Yokota, T. Ueno, I. Tanida, T. Chiba, K. Tanaka, and E. Kominami. 2006. "Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals." *J Biol Chem* 281 (7):4035-41. doi: 10.1074/jbc.M512283200.
- Jackson, W. T., T. H. Giddings, Jr., M. P. Taylor, S. Mulinyawe, M. Rabinovitch, R. R. Kopito, and K. Kirkegaard. 2005. "Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses." *PLoS Biol* 3 (5):e156. doi: 10.1371/journal.pbio.0030156.
- Jagannath, C., D. R. Lindsey, S. Dhandayuthapani, Y. Xu, R. L. Hunter, Jr., and N. T. Eissa. 2009. "Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells." *Nat Med* 15 (3):267-76. doi: 10.1038/nm.1928.
- Jewett, T. J., N. J. Miller, C. A. Dooley, and T. Hackstadt. 2010. "The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion." *PLoS Pathog* 6 (7):e1000997. doi: 10.1371/journal.ppat.1000997.
- Jiang, X., C. Shen, J. Rey-Ladino, H. Yu, and R. C. Brunham. 2008. "Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in Chlamydia muridarum antigen presentation and induction of protective immunity." *Infect Immun* 76 (6):2392-401. doi: 10.1128/IAI.01584-07.
- Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena. 2012. "Cross-presentation by dendritic cells." *Nat Rev Immunol* 12 (8):557-69. doi: 10.1038/nri3254.
- Johansen, T., and T. Lamark. 2011. "Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins." *Autophagy* 7 (3):279-96.
- Johansson, M., K. Schon, M. Ward, and N. Lycke. 1997a. "Genital tract infection with Chlamydia trachomatis fails to induce protective immunity in gamma interferon receptor-deficient mice despite a strong local immunoglobulin A response." *Infect Immun* 65 (3):1032-44.
- Johansson, M., K. Schon, M. Ward, and N. Lycke. 1997b. "Studies in knockout mice reveal that anti-chlamydial protection requires TH1 cells producing IFN-gamma: is this true for humans?" *Scand J Immunol* 46 (6):546-52.
- Johnson, R. M. 2004. "Murine oviduct epithelial cell cytokine responses to Chlamydia muridarum infection include interleukin-12-p70 secretion." *Infect Immun* 72 (7):3951-60. doi: 10.1128/IAI.72.7.3951-3960.2004.
- Johnson, R. M., H. Yu, N. O. Strank, K. Karunakaran, Y. Zhu, and R. C. Brunham. 2018. "B Cell Presentation of Chlamydia Antigen Selects Out Protective CD4gamma13 T Cells: Implications for Genital Tract Tissue-Resident Memory Lymphocyte Clusters." *Infect Immun* 86 (2). doi: 10.1128/IAI.00614-17.
- Johnstone, C., M. Ramos, B. Garcia-Barreno, D. Lopez, J. A. Melero, and M. Del Val. 2012. "Exogenous, TAP-independent lysosomal presentation of a respiratory syncytial virus CTL epitope." *Immunol Cell Biol* 90 (10):978-82. doi: 10.1038/icb.2012.43.
- Jones, E. Y. 1997. "MHC class I and class II structures." *Curr Opin Immunol* 9 (1):75-9.
- Jorgensen, T. N., C. Haase, and B. K. Michelsen. 2002. "Treatment of an immortalized APC cell line with both cytokines and LPS ensures effective T-cell activation in vitro." *Scand J Immunol* 56 (5):492-503.
- Jouvin-Marche, E., M. G. Morgado, C. Leguern, D. Voegtli, F. Bonhomme, and P. A. Cazenave. 1989. "The mouse Igh-1a and Igh-1b H chain constant regions are derived from two distinct isotypic genes." *Immunogenetics* 29 (2):92-7.
- Juan, T., and M. Furthauer. 2018. "Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles." *Semin Cell Dev Biol* 74:66-77. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.022.
- Kabara, J. J., D. M. Swieczkowski, A. J. Conley, and J. P. Truant. 1972. "Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents." *Antimicrob Agents Chemother* 2 (1):23-8.
- Kapsenberg, M. L. 2003. "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* 3 (12):984-93. doi: 10.1038/nri1246.
- Katz, E., M. R. Deehan, S. Seatter, C. Lord, R. D. Sturrock, and M. M. Harnett. 2001. "B cell receptor-stimulated mitochondrial phospholipase A2 activation and resultant disruption of

- mitochondrial membrane potential correlate with the induction of apoptosis in WEHI-231 B cells." *J Immunol* 166 (1):137-47.
- Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr. 2001. "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." *Cell* 106 (2):145-55.
- Kawaguchi, Y., J. J. Kovacs, A. McLaurin, J. M. Vance, A. Ito, and T. P. Yao. 2003. "The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress." *Cell* 115 (6):727-38.
- Kelly, D. M., A. M. ten Bokum, S. M. O'Leary, M. P. O'Sullivan, and J. Keane. 2008. "Bystander macrophage apoptosis after Mycobacterium tuberculosis H37Ra infection." *Infect Immun* 76 (1):351-60. doi: 10.1128/IAI.00614-07.
- Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J. J. Lemasters. 2007. "Selective degradation of mitochondria by mitophagy." *Arch Biochem Biophys* 462 (2):245-53. doi: 10.1016/j.abb.2007.03.034.
- Kimmey, J. M., and C. L. Stallings. 2016. "Bacterial Pathogens versus Autophagy: Implications for Therapeutic Interventions." *Trends Mol Med* 22 (12):1060-1076. doi: 10.1016/j.molmed.2016.10.008.
- Kirwan, S., D. Merriam, N. Barsby, A. McKinnon, and D. N. Burshtyn. 2006. "Vaccinia virus modulation of natural killer cell function by direct infection." *Virology* 347 (1):75-87. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.037.
- Kleba, B. J., E. Banta, E. A. Lindquist, and R. S. Stephens. 2002. "Recruitment of mammalian cell fibronectin to the surface of Chlamydia trachomatis." *Infect Immun* 70 (7):3935-8.
- Klibi, J., T. Niki, A. Riedel, C. Pioche-Durieu, S. Souquere, E. Rubinstein, S. Le Moulec, J. Guigay, M. Hirashima, F. Guemira, D. Adhikary, J. Mautner, and P. Busson. 2009. "Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells." *Blood* 113 (9):1957-66. doi: 10.1182/blood-2008-02-142596.
- Kloetzel, P. M., and F. Ossendorp. 2004. "Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation." *Curr Opin Immunol* 16 (1):76-81.
- Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter. 2000. "Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product." *J Virol* 74 (21):10063-73.
- Knittler, M. R., A. Berndt, S. Bocker, P. Dutow, F. Hanel, D. Heuer, D. Kagebein, A. Klos, S. Koch, E. Liebler-Tenorio, C. Ostermann, P. Reinhold, H. P. Saluz, G. Schofl, P. Sehnert, and K. Sachse. 2014. "Chlamydia psittaci: new insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity." *Int J Med Microbiol* 304 (7):877-93. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.06.010.
- Knodler, L. A., and J. Celli. 2011. "Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy." *Cell Microbiol* 13 (9):1319-27. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01632.x.
- Kohn, A., J. Gitelman, and M. Inbar. 1980. "Unsaturated free fatty acids inactivate animal enveloped viruses." *Arch Virol* 66 (4):301-7.
- Kowal, J., G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J. P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, and C. Thery. 2016. "Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (8):E968-77. doi: 10.1073/pnas.1521230113.
- Krawczyk, C. M., T. Holowka, J. Sun, J. Blagih, E. Amiel, R. J. DeBerardinis, J. R. Cross, E. Jung, C. B. Thompson, R. G. Jones, and E. J. Pearce. 2010. "Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation." *Blood* 115 (23):4742-9. doi: 10.1182/blood-2009-10-249540.
- Kroemer, G., G. Marino, and B. Levine. 2010. "Autophagy and the integrated stress response." *Mol Cell* 40 (2):280-93. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
- Krzewski, K., and J. E. Coligan. 2012. "Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis." *Front Immunol* 3:335. doi: 10.3389/fimmu.2012.00335.

- Kumar, Y., and R. H. Valdivia. 2008. "Actin and intermediate filaments stabilize the Chlamydia trachomatis vacuole by forming dynamic structural scaffolds." *Cell Host Microbe* 4 (2):159-69. doi: 10.1016/j.chom.2008.05.018.
- Kuo, C. C., L. A. Jackson, L. A. Campbell, and J. T. Grayston. 1995. "Chlamydia pneumoniae (TWAR)." *Clin Microbiol Rev* 8 (4):451-61.
- Kurihara, Y., T. Kanki, Y. Aoki, Y. Hirota, T. Saigusa, T. Uchiumi, and D. Kang. 2012. "Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast." *J Biol Chem* 287 (5):3265-72. doi: 10.1074/jbc.M111.280156.
- Kwan, W. H., W. van der Touw, E. Paz-Artal, M. O. Li, and P. S. Heeger. 2013. "Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells." *J Exp Med* 210 (2):257-68. doi: 10.1084/jem.20121525.
- Kyei, G. B., C. Dinkins, A. S. Davis, E. Roberts, S. B. Singh, C. Dong, L. Wu, E. Kominami, T. Ueno, A. Yamamoto, M. Federico, A. Panganiban, I. Vergne, and V. Deretic. 2009. "Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages." *J Cell Biol* 186 (2):255-68. doi: 10.1083/jcb.200903070.
- Lacy, P., and J. L. Stow. 2011. "Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways." *Blood* 118 (1):9-18. doi: 10.1182/blood-2010-08-265892.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259):680-5.
- Lamb, C. A., T. Yoshimori, and S. A. Tooze. 2013. "The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (12):759-74. doi: 10.1038/nrm3696.
- Lanier, L. L. 2015. "NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense." *Cancer Immunol Res* 3 (6):575-82. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0098.
- Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2001. "Regulation of T cell immunity by dendritic cells." *Cell* 106 (3):263-6.
- Larsson, K., B. Noren, and G. Odham. 1975. "Antimicrobial effect of simple lipids with different branches at the methyl end group." *Antimicrob Agents Chemother* 8 (6):742-50.
- Lazarou, M. 2015. "Keeping the immune system in check: a role for mitophagy." *Immunol Cell Biol* 93 (1):3-10. doi: 10.1038/icb.2014.75.
- Le Naour, F., L. Hohenkirk, A. Grolleau, D. E. Misek, P. Lescure, J. D. Geiger, S. Hanash, and L. Beretta. 2001. "Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics." *J Biol Chem* 276 (21):17920-31. doi: 10.1074/jbc.M100156200.
- Lee, J. Y., H. Koga, Y. Kawaguchi, W. Tang, E. Wong, Y. S. Gao, U. B. Pandey, S. Kaushik, E. Tresse, J. Lu, J. P. Taylor, A. M. Cuervo, and T. P. Yao. 2010. "HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy." *EMBO J* 29 (5):969-80. doi: 10.1038/emboj.2009.405.
- Lee, J. Y., Y. Nagano, J. P. Taylor, K. L. Lim, and T. P. Yao. 2010. "Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy." *J Cell Biol* 189 (4):671-9. doi: 10.1083/jcb.201001039.
- Lemasters, J. J. 2005. "Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." *Rejuvenation Res* 8 (1):3-5. doi: 10.1089/rej.2005.8.3.
- Lemasters, J. J. 2007. "Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism." *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1:S31-7. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04643.x.
- Leonhardt, R. M., S. J. Lee, P. B. Kavathas, and P. Cresswell. 2007. "Severe tryptophan starvation blocks onset of conventional persistence and reduces reactivation of Chlamydia trachomatis." *Infect Immun* 75 (11):5105-17. doi: 10.1128/IAI.00668-07.
- Levine, B. 2005. "Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense." *Cell* 120 (2):159-62. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.005.

- Levine, B., N. Mizushima, and H. W. Virgin. 2011. "Autophagy in immunity and inflammation." *Nature* 469 (7330):323-35. doi: 10.1038/nature09782.
- Li, B., Z. Lei, B. D. Lichty, D. Li, G. M. Zhang, Z. H. Feng, Y. Wan, and B. Huang. 2010. "Autophagy facilitates major histocompatibility complex class I expression induced by IFN-gamma in B16 melanoma cells." *Cancer Immunol Immunother* 59 (2):313-21. doi: 10.1007/s00262-009-0752-1.
- Li, K., K. J. Anderson, Q. Peng, A. Noble, B. Lu, A. P. Kelly, N. Wang, S. H. Sacks, and W. Zhou. 2008. "Cyclic AMP plays a critical role in C3a-receptor-mediated regulation of dendritic cells in antigen uptake and T-cell stimulation." *Blood* 112 (13):5084-94. doi: 10.1182/blood-2008-05-156646.
- Liu, C., S. Yu, K. Zinn, J. Wang, L. Zhang, Y. Jia, J. C. Kappes, S. Barnes, R. P. Kimberly, W. E. Grizzle, and H. G. Zhang. 2006. "Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function." *J Immunol* 176 (3):1375-85.
- Liu, S. J., and J. McHowat. 1998. "Stimulation of different phospholipase A2 isoforms by TNF-alpha and IL-1beta in adult rat ventricular myocytes." *Am J Physiol* 275 (4 Pt 2):H1462-72.
- Liu, T., O. E. Guevara, R. R. Warburton, N. S. Hill, M. Gaestel, and U. S. Kayyali. 2010. "Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia." *Am J Physiol Cell Physiol* 299 (2):C363-73. doi: 10.1152/ajpcell.00057.2010.
- Liu, Y., L. Wang, T. Kikuri, K. Akiyama, C. Chen, X. Xu, R. Yang, W. Chen, S. Wang, and S. Shi. 2011. "Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha." *Nat Med* 17 (12):1594-601. doi: 10.1038/nm.2542.
- Loder, F., B. Mutschler, R. J. Ray, C. J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M. C. Lamers, and R. Carsetti. 1999. "B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals." *J Exp Med* 190 (1):75-89.
- Lu, G., B. M. Janjic, J. Janjic, T. L. Whiteside, W. J. Storkus, and N. L. Vujanovic. 2002. "Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand." *J Immunol* 168 (4):1831-9.
- Lu, H., C. Shen, and R. C. Brunham. 2000. "Chlamydia trachomatis infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18." *J Immunol* 165 (3):1463-9.
- Lu, H., and G. Zhong. 1999. "Interleukin-12 production is required for chlamydial antigen-pulsed dendritic cells to induce protection against live Chlamydia trachomatis infection." *Infect Immun* 67 (4):1763-9.
- Luster, A. D., R. Alon, and U. H. von Andrian. 2005. "Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets." *Nat Immunol* 6 (12):1182-90. doi: 10.1038/ni1275.
- Lyons, J. M., J. I. Ito, Jr., A. S. Pena, and S. A. Morre. 2005. "Differences in growth characteristics and elementary body associated cytotoxicity between Chlamydia trachomatis oculogenital serovars D and H and Chlamydia muridarum." *J Clin Pathol* 58 (4):397-401. doi: 10.1136/jcp.2004.021543.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, A. Kimchi, and G. Kroemer. 2007. "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (9):741-52. doi: 10.1038/nrm2239.
- Malhotra, M., S. Sood, A. Mukherjee, S. Muralidhar, and M. Bala. 2013. "Genital Chlamydia trachomatis: an update." *Indian J Med Res* 138 (3):303-16.
- Manavi, K. 2006. "A review on infection with Chlamydia trachomatis." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 20 (6):941-51. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2006.06.003.
- Manzanillo, P. S., J. S. Ayres, R. O. Watson, A. C. Collins, G. Souza, C. S. Rae, D. S. Schneider, K. Nakamura, M. U. Shiloh, and J. S. Cox. 2013. "The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens." *Nature* 501 (7468):512-6. doi: 10.1038/nature12566.
- Mao, H., W. Tu, G. Qin, H. K. Law, S. F. Sia, P. L. Chan, Y. Liu, K. T. Lam, J. Zheng, M. Peiris, and Y. L. Lau. 2009. "Influenza virus directly infects human natural killer cells and induces cell apoptosis." *J Virol* 83 (18):9215-22. doi: 10.1128/JVI.00805-09.

- Marcenaro, E., B. Ferranti, M. Falco, L. Moretta, and A. Moretta. 2008. "Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC." *Int Immunol* 20 (9):1155-67. doi: 10.1093/intimm/dxn073.
- Margo, C. E., and Z. D. Mulla. 1998. "Malignant tumors of the orbit. Analysis of the Florida Cancer Registry." *Ophthalmology* 105 (1):185-90.
- Mariappan, N., R. N. Soorappan, M. Haque, S. Sriramula, and J. Francis. 2007. "TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (5):H2726-37. doi: 10.1152/ajpheart.00376.2007.
- Martin, R. M., J. L. Brady, and A. M. Lew. 1998. "The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice." *J Immunol Methods* 212 (2):187-92.
- Martin, R. M., A. Silva, and A. M. Lew. 1997. "The Igh-1 sequence of the non-obese diabetic (NOD) mouse assigns it to the IgG2c isotype." *Immunogenetics* 46 (2):167-8.
- Martinez-Menarguez, J. A., H. J. Geuze, J. W. Slot, and J. Klumperman. 1999. "Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles." *Cell* 98 (1):81-90. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80608-X.
- Matsuda, N., S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C. A. Gautier, Y. S. Sou, S. Saiki, S. Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori, and K. Tanaka. 2010. "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy." *J Cell Biol* 189 (2):211-21. doi: 10.1083/jcb.200910140.
- Matsumoto, A., H. Bessho, K. Uehira, and T. Suda. 1991. "Morphological studies of the association of mitochondria with chlamydial inclusions and the fusion of chlamydial inclusions." *J Electron Microscop* (Tokyo) 40 (5):356-63.
- Matsuyama, A., T. Shimazu, Y. Sumida, A. Saito, Y. Yoshimatsu, D. Seigneurin-Berny, H. Osada, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, S. Horinouchi, and M. Yoshida. 2002. "In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation." *EMBO J* 21 (24):6820-31.
- Maxion, H. K., and K. A. Kelly. 2002. "Chemokine expression patterns differ within anatomically distinct regions of the genital tract during *Chlamydia trachomatis* infection." *Infect Immun* 70 (3):1538-46.
- McClarty, G. 1994. "Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism." *Trends Microbiol* 2 (5):157-64.
- McDonald, M. K., Y. Tian, R. A. Qureshi, M. Gormley, A. Ertel, R. Gao, E. Aradillas Lopez, G. M. Alexander, A. Sacan, P. Fortina, and S. K. Ajit. 2014. "Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain." *Pain* 155 (8):1527-39. doi: 10.1016/j.pain.2014.04.029.
- McKeithen, D. N., Y. O. Omosun, K. Ryans, J. Mu, Z. Xie, T. Simoneaux, U. Blas-Machado, F. O. Eko, C. M. Black, J. U. Igietseme, and Q. He. 2017. "The emerging role of ASC in dendritic cell metabolism during *Chlamydia* infection." *PLoS One* 12 (12):e0188643. doi: 10.1371/journal.pone.0188643.
- McPhillips, K., W. J. Janssen, M. Ghosh, A. Byrne, S. Gardai, L. Remigio, D. L. Bratton, J. L. Kang, and P. Henson. 2007. "TNF-alpha inhibits macrophage clearance of apoptotic cells via cytosolic phospholipase A2 and oxidant-dependent mechanisms." *J Immunol* 178 (12):8117-26.
- Meijer, W. H., I. J. van der Klei, M. Veenhuis, and J. A. Kiel. 2007. "ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes." *Autophagy* 3 (2):106-16.
- Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* 106 (3):255-8.
- Melo, S. A., L. B. Luecke, C. Kahlert, A. F. Fernandez, S. T. Gammon, J. Kaye, V. S. LeBleu, E. A. Mittendorf, J. Weitz, N. Rahbari, C. Reissfelder, C. Pilarsky, M. F. Fraga, D. Piwnica-Worms,

- and R. Kalluri. 2015. "Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer." *Nature* 523 (7559):177-82. doi: 10.1038/nature14581.
- Menozi, F. D., K. Pethe, P. Bifani, F. Soncin, M. J. Brennan, and C. Loch. 2002. "Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans." *Mol Microbiol* 43 (6):1379-86.
- Mizushima, N. 2007. "Autophagy: process and function." *Genes Dev* 21 (22):2861-73. doi: 10.1101/gad.1599207.
- Mizushima, N. 2010. "The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation." *Curr Opin Cell Biol* 22 (2):132-9. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.004.
- Mizushima, N., and M. Komatsu. 2011. "Autophagy: renovation of cells and tissues." *Cell* 147 (4):728-41. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Mizushima, N., A. Kuma, Y. Kobayashi, A. Yamamoto, M. Matsubae, T. Takao, T. Natsume, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2003. "Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate." *J Cell Sci* 116 (Pt 9):1679-88.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhi, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2001. "Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells." *J Cell Biol* 152 (4):657-68.
- Molleken, K., and J. H. Hegemann. 2017. "Acquisition of Rab11 and Rab11-Fip2-A novel strategy for Chlamydia pneumoniae early survival." *PLoS Pathog* 13 (8):e1006556. doi: 10.1371/journal.ppat.1006556.
- Molleken, K., E. Schmidt, and J. H. Hegemann. 2010. "Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs." *Mol Microbiol* 78 (4):1004-17. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07386.x.
- Monleon, I., M. J. Martinez-Lorenzo, L. Monteagudo, P. Laserra, M. Taules, M. Iturralde, A. Pineiro, L. Larrad, M. A. Alava, J. Naval, and A. Anel. 2001. "Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells." *J Immunol* 167 (12):6736-44.
- Montecalvo, A., W. J. Shufesky, D. B. Stolz, M. G. Sullivan, Z. Wang, S. J. Divito, G. D. Papworth, S. C. Watkins, P. D. Robbins, A. T. Larregina, and A. E. Morelli. 2008. "Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition." *J Immunol* 180 (5):3081-90.
- Moore, T., G. A. Ananaba, J. Bolier, S. Bowers, T. Belay, F. O. Eko, and J. U. Igietseme. 2002. "Fc receptor regulation of protective immunity against Chlamydia trachomatis." *Immunology* 105 (2):213-21.
- Morel, J. B., and J. L. Dangl. 1997. "The hypersensitive response and the induction of cell death in plants." *Cell Death Differ* 4 (8):671-83. doi: 10.1038/sj.cdd.4400309.
- Morrison, R. P. 2000. "Differential sensitivities of Chlamydia trachomatis strains to inhibitory effects of gamma interferon." *Infect Immun* 68 (10):6038-40.
- Morrison, S. G., H. Su, H. D. Caldwell, and R. P. Morrison. 2000. "Immunity to murine Chlamydia trachomatis genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells." *Infect Immun* 68 (12):6979-87.
- Mpiga, P., and M. Ravaoarinoro. 2006. "Chlamydia trachomatis persistence: an update." *Microbiol Res* 161 (1):9-19. doi: 10.1016/j.micres.2005.04.004.
- Munich, S., A. Sobo-Vujanovic, W. J. Buchser, D. Beer-Stolz, and N. L. Vujanovic. 2012. "Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands." *Oncoimmunology* 1 (7):1074-1083. doi: 10.4161/onci.20897.
- Munz, C. 2010. "Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore?" *Curr Opin Immunol* 22 (1):89-93. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.016.
- Murphy, K. M., and B. Stockinger. 2010. "Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances." *Nat Immunol* 11 (8):674-80. doi: 10.1038/ni.1899.
- Murray, P. J. 2005. "NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers?" *Curr Opin Immunol* 17 (4):352-8. doi: 10.1016/j.coi.2005.05.006.

- Nagaraj, N., J. R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, J. Kelso, S. Paabo, and M. Mann. 2011. "Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line." *Mol Syst Biol* 7:548. doi: 10.1038/msb.2011.81.
- Narendra, D. P., S. M. Jin, A. Tanaka, D. F. Suen, C. A. Gautier, J. Shen, M. R. Cookson, and R. J. Youle. 2010. "PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin." *PLoS Biol* 8 (1):e1000298. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.
- Neefjes, J., and C. Sadaka. 2012. "Into the intracellular logistics of cross-presentation." *Front Immunol* 3:31. doi: 10.3389/fimmu.2012.00031.
- Netea, M. G., L. A. Joosten, E. Latz, K. H. Mills, G. Natoli, H. G. Stunnenberg, L. A. O'Neill, and R. J. Xavier. 2016. "Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease." *Science* 352 (6284):aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098.
- Netea, M. G., E. Latz, K. H. Mills, and L. A. O'Neill. 2015. "Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense." *Nat Immunol* 16 (7):675-9. doi: 10.1038/ni.3178.
- Neuberger, M. S., and K. Rajewsky. 1981. "Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies." *Eur J Immunol* 11 (12):1012-6. doi: 10.1002/eji.1830111212.
- Newman, K. C., and E. M. Riley. 2007. "Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens." *Nat Rev Immunol* 7 (4):279-91. doi: 10.1038/nri2057.
- Nieman, C. 1954. "Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms." *Bacteriol Rev* 18 (2):147-63.
- Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2006. "Fcγ receptors: old friends and new family members." *Immunity* 24 (1):19-28. doi: 10.1016/j.immuni.2005.11.010.
- Noelle, R., and E. C. Snow. 1992. "T helper cells." *Curr Opin Immunol* 4 (3):333-7.
- Nogueira, C. V., X. Zhang, N. Giovannone, E. L. Sennott, and M. N. Starnbach. 2015. "Protective immunity against *Chlamydia trachomatis* can engage both CD4+ and CD8+ T cells and bridge the respiratory and genital mucosae." *J Immunol* 194 (5):2319-29. doi: 10.4049/jimmunol.1402675.
- Nowag, H., B. Guhl, K. Thriene, S. Romao, U. Ziegler, J. Dengjel, and C. Munz. 2014. "Macroautophagy Proteins Assist Epstein Barr Virus Production and Get Incorporated Into the Virus Particles." *EBioMedicine* 1 (2-3):116-25. doi: 10.1016/j.ebiom.2014.11.007.
- O'Connor, G. M., O. M. Hart, and C. M. Gardiner. 2006. "Putting the natural killer cell in its place." *Immunology* 117 (1):1-10. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02256.x.
- O'Sullivan, T. E., J. C. Sun, and L. L. Lanier. 2015. "Natural Killer Cell Memory." *Immunity* 43 (4):634-45. doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.013.
- Ojcius, D. M., Y. Bravo de Alba, J. M. Kanellopoulos, R. A. Hawkins, K. A. Kelly, R. G. Rank, and A. Dautry-Varsat. 1998. "Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells." *J Immunol* 160 (3):1297-303.
- Ojcius, D. M., P. Souque, J. L. Perfettini, and A. Dautry-Varsat. 1998. "Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*." *J Immunol* 161 (8):4220-6.
- Okatsu, K., K. Saisho, M. Shimanuki, K. Nakada, H. Shitara, Y. S. Sou, M. Kimura, S. Sato, N. Hattori, M. Komatsu, K. Tanaka, and N. Matsuda. 2010. "p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria." *Genes Cells* 15 (8):887-900. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x.
- Omsland, A., B. S. Sixt, M. Horn, and T. Hackstadt. 2014. "Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities." *FEMS Microbiol Rev* 38 (4):779-801. doi: 10.1111/1574-6976.12059.
- Paguirigan, A. M., G. I. Byrne, S. Becht, and J. M. Carlin. 1994. "Cytokine-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase induction in response to *Chlamydia* infection in human macrophage cultures." *Infect Immun* 62 (4):1131-6.
- Paland, N., L. Bohme, R. K. Gurumurthy, A. Maurer, A. J. Szczeppek, and T. Rudel. 2008. "Reduced display of tumor necrosis factor receptor I at the host cell surface supports infection with *Chlamydia trachomatis*." *J Biol Chem* 283 (10):6438-48. doi: 10.1074/jbc.M708422200.

- Paludan, C., D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl, and C. Munz. 2005. "Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy." *Science* 307 (5709):593-6. doi: 10.1126/science.1104904.
- Pan, B. T., K. Teng, C. Wu, M. Adam, and R. M. Johnstone. 1985. "Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes." *J Cell Biol* 101 (3):942-8.
- Pannekoek, Y., G. Morelli, B. Kusecek, S. A. Morre, J. M. Ossewaarde, A. A. Langerak, and A. van der Ende. 2008. "Multi locus sequence typing of Chlamydiales: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria Chlamydia trachomatis." *BMC Microbiol* 8:42. doi: 10.1186/1471-2180-8-42.
- Pantchev, A., R. Sting, R. Bauerfeind, J. Tyczka, and K. Sachse. 2010. "Detection of all Chlamydomphila and Chlamydia spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33 (6):473-84. doi: 10.1016/j.cimid.2009.08.002.
- Pantel, A., A. Teixeira, E. Haddad, E. G. Wood, R. M. Steinman, and M. P. Longhi. 2014. "Direct type I IFN but not MDA5/TLR3 activation of dendritic cells is required for maturation and metabolic shift to glycolysis after poly IC stimulation." *PLoS Biol* 12 (1):e1001759. doi: 10.1371/journal.pbio.1001759.
- Parker, B. S., J. Rautela, and P. J. Hertzog. 2016. "Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 16 (3):131-44. doi: 10.1038/nrc.2016.14.
- Parkin, J., and B. Cohen. 2001. "An overview of the immune system." *Lancet* 357 (9270):1777-89. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
- Paul, W. E., and R. A. Seder. 1994. "Lymphocyte responses and cytokines." *Cell* 76 (2):241-51.
- Paunovic, V., H. P. Carroll, K. Vandenbroeck, and M. Gadina. 2008. "Signalling, inflammation and arthritis: crossed signals: the role of interleukin (IL)-12, -17, -23 and -27 in autoimmunity." *Rheumatology (Oxford)* 47 (6):771-6. doi: 10.1093/rheumatology/kem352.
- Pearce, E. J., and B. Everts. 2015. "Dendritic cell metabolism." *Nat Rev Immunol* 15 (1):18-29. doi: 10.1038/nri3771.
- Pegram, H. J., D. M. Andrews, M. J. Smyth, P. K. Darcy, and M. H. Kershaw. 2011. "Activating and inhibitory receptors of natural killer cells." *Immunol Cell Biol* 89 (2):216-24. doi: 10.1038/icb.2010.78.
- Peng, Q., K. Li, K. Anderson, C. A. Farrar, B. Lu, R. A. Smith, S. H. Sacks, and W. Zhou. 2008. "Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction." *Blood* 111 (4):2452-61. doi: 10.1182/blood-2007-06-095018.
- Perfettini, J. L., T. Darville, G. Gachelin, P. Souque, M. Huerre, A. Dautry-Varsat, and D. M. Ojcius. 2000. "Effect of Chlamydia trachomatis infection and subsequent tumor necrosis factor alpha secretion on apoptosis in the murine genital tract." *Infect Immun* 68 (4):2237-44.
- Perfettini, J. L., V. Hospital, L. Stahl, T. Jungas, P. Verbeke, and D. M. Ojcius. 2003. "Cell death and inflammation during infection with the obligate intracellular pathogen, Chlamydia." *Biochimie* 85 (8):763-9.
- Peters, J., D. P. Wilson, G. Myers, P. Timms, and P. M. Bavoil. 2007. "Type III secretion a la Chlamydia." *Trends Microbiol* 15 (6):241-51. doi: 10.1016/j.tim.2007.04.005.
- Peters, W., and J. D. Ernst. 2003. "Mechanisms of cell recruitment in the immune response to Mycobacterium tuberculosis." *Microbes Infect* 5 (2):151-8.
- Pickrell, A. M., and R. J. Youle. 2015. "The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease." *Neuron* 85 (2):257-73. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.007.
- Pollard, K. M., D. M. Cauvi, C. B. Toomey, K. V. Morris, and D. H. Kono. 2013. "Interferon-gamma and systemic autoimmunity." *Discov Med* 16 (87):123-31.
- Popoff, V., F. Adolf, B. Brugger, and F. Wieland. 2011. "COPI budding within the Golgi stack." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (11):a005231. doi: 10.1101/cshperspect.a005231.

- Pospischil, A., R. Thoma, M. Hilbe, P. Grest, and J. O. Gebbers. 2002. "Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1)." *Swiss Med Wkly* 132 (5-6):64-6. doi: 2002/05/smw-09911.
- Prince, H. N. 1959. "Effect of pH on the antifungal activity of undecylenic acid and its calcium salt." *J Bacteriol* 78:788-91.
- Puleston, D. J., and A. K. Simon. 2014. "Autophagy in the immune system." *Immunology* 141 (1):1-8. doi: 10.1111/imm.12165.
- Puolakkainen, M., L. A. Campbell, T. M. Lin, T. Richards, D. L. Patton, and C. C. Kuo. 2003. "Cell-to-cell contact of human monocytes with infected arterial smooth-muscle cells enhances growth of *Chlamydia pneumoniae*." *J Infect Dis* 187 (3):435-40. doi: 10.1086/368267.
- Qi, H. Y., M. P. Daniels, Y. Liu, L. Y. Chen, S. Alsaaty, S. J. Levine, and J. H. Shelhamer. 2011. "A cytosolic phospholipase A2-initiated lipid mediator pathway induces autophagy in macrophages." *J Immunol* 187 (10):5286-92. doi: 10.4049/jimmunol.1004004.
- Quah, B. J., and H. C. O'Neill. 2005. "The immunogenicity of dendritic cell-derived exosomes." *Blood Cells Mol Dis* 35 (2):94-110. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.05.002.
- Radomski, N., R. Eienkel, A. Muller, and M. R. Knittler. 2016. "Chlamydia-host cell interaction not only from a bird's eye view: some lessons from *Chlamydia psittaci*." *FEBS Lett* 590 (21):3920-3940. doi: 10.1002/1873-3468.12295.
- Radomski, N., D. Kagebein, E. Liebler-Tenorio, A. Karger, E. Rufer, B. A. Tews, S. Nagel, R. Eienkel, A. Muller, A. Rebbig, and M. R. Knittler. 2017. "Mito-xenophagic killing of bacteria is coordinated by a metabolic switch in dendritic cells." *Sci Rep* 7 (1):3923. doi: 10.1038/s41598-017-04142-5.
- Radomski, N., A. Rebbig, R. M. Leonhardt, and M. R. Knittler. 2017. "Xenophagic pathways and their bacterial subversion in cellular self-defense - pialphanutaulalpha rhoepsiloniota - everything is in flux." *Int J Med Microbiol*. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.10.012.
- Raghavan, M., N. Del Cid, S. M. Rizvi, and L. R. Peters. 2008. "MHC class I assembly: out and about." *Trends Immunol* 29 (9):436-43. doi: 10.1016/j.it.2008.06.004.
- Rajalingam, K., M. Oswald, K. Gottschalk, and T. Rudel. 2007. "Smac/DIABLO is required for effector caspase activation during apoptosis in human cells." *Apoptosis* 12 (8):1503-10. doi: 10.1007/s10495-007-0067-7.
- Rajalingam, K., M. Sharma, C. Lohmann, M. Oswald, O. Thieck, C. J. Froelich, and T. Rudel. 2008. "Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in *Chlamydia trachomatis*-infected cells." *PLoS One* 3 (9):e3102. doi: 10.1371/journal.pone.0003102.
- Rajalingam, K., M. Sharma, N. Paland, R. Hurwitz, O. Thieck, M. Oswald, N. Machuy, and T. Rudel. 2006. "IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of *C. trachomatis*-infected cells." *PLoS Pathog* 2 (10):e114. doi: 10.1371/journal.ppat.0020114.
- Rajewsky, K. 1996. "Clonal selection and learning in the antibody system." *Nature* 381 (6585):751-8. doi: 10.1038/381751a0.
- Rak, G. D., E. M. Mace, P. P. Banerjee, T. Svitkina, and J. S. Orange. 2011. "Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse." *PLoS Biol* 9 (9):e1001151. doi: 10.1371/journal.pbio.1001151.
- Ramsey, K. H., I. M. Sagar, S. V. Rana, J. Gupta, S. M. Holland, and G. I. Byrne. 2001. "Role for inducible nitric oxide synthase in protection from chronic *Chlamydia trachomatis* urogenital disease in mice and its regulation by oxygen free radicals." *Infect Immun* 69 (12):7374-9. doi: 10.1128/IAI.69.12.7374-7379.2001.
- Randow, F., and R. J. Youle. 2014. "Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria." *Cell Host Microbe* 15 (4):403-11. doi: 10.1016/j.chom.2014.03.012.
- Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze. 1996. "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." *J Exp Med* 183 (3):1161-72.
- Raposo, G., and W. Stoorvogel. 2013. "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." *J Cell Biol* 200 (4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138.

- Raposo, G., D. Tenza, S. Mecheri, R. Peronet, C. Bonnerot, and C. Desaymard. 1997. "Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation." *Mol Biol Cell* 8 (12):2631-45.
- Rasmussen, S. J., L. Eckmann, A. J. Quayle, L. Shen, Y. X. Zhang, D. J. Anderson, J. Fierer, R. S. Stephens, and M. F. Kagnoff. 1997. "Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis." *J Clin Invest* 99 (1):77-87. doi: 10.1172/JCI119136.
- Rathje, L. S., N. Nordgren, T. Pettersson, D. Ronnlund, J. Widengren, P. Aspenstrom, and A. K. Gad. 2014. "Oncogenes induce a vimentin filament collapse mediated by HDAC6 that is linked to cell stiffness." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (4):1515-20. doi: 10.1073/pnas.1300238111.
- Ravikumar, B., S. Sarkar, J. E. Davies, M. Futter, M. Garcia-Arencibia, Z. W. Green-Thompson, M. Jimenez-Sanchez, V. I. Korolchuk, M. Lichtenberg, S. Luo, D. C. Massey, F. M. Menzies, K. Moreau, U. Narayanan, M. Renna, F. H. Siddiqi, B. R. Underwood, A. R. Winslow, and D. C. Rubinstein. 2010. "Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* 90 (4):1383-435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009.
- Reggiori, F., M. Komatsu, K. Finley, and A. Simonsen. 2012. "Autophagy: more than a nonselective pathway." *Int J Cell Biol* 2012:219625. doi: 10.1155/2012/219625.
- Reiners, K. S., J. Dassler, C. Coch, and E. Pogge von Strandmann. 2014. "Role of Exosomes Released by Dendritic Cells and/or by Tumor Targets: Regulation of NK Cell Plasticity." *Front Immunol* 5:91. doi: 10.3389/fimmu.2014.00091.
- Reinhold, P., C. Ostermann, E. Liebler-Tenorio, A. Berndt, A. Vogel, J. Lambertz, M. Rothe, A. Ruttger, E. Schubert, and K. Sachse. 2012. "A bovine model of respiratory Chlamydia psittaci infection: challenge dose titration." *PLoS One* 7 (1):e30125. doi: 10.1371/journal.pone.0030125.
- Renoux, V. M., B. Bisig, I. Langers, E. Dortu, B. Clemenceau, M. Thiry, C. Deroanne, A. Colige, J. Boniver, P. Delvenne, and N. Jacobs. 2011. "Human papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion." *Eur J Immunol* 41 (11):3240-52. doi: 10.1002/eji.201141693.
- Rey-Ladino, J., K. M. Koochesfahani, M. L. Zaharik, C. Shen, and R. C. Brunham. 2005. "A live and inactivated Chlamydia trachomatis mouse pneumonitis strain induces the maturation of dendritic cells that are phenotypically and immunologically distinct." *Infect Immun* 73 (3):1568-77. doi: 10.1128/IAI.73.3.1568-1577.2005.
- Richards, T. S., A. E. Knowlton, and S. S. Grieshaber. 2013. "Chlamydia trachomatis homotypic inclusion fusion is promoted by host microtubule trafficking." *BMC Microbiol* 13:185. doi: 10.1186/1471-2180-13-185.
- Rikihisa, Y. 1984. "Glycogen autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by rickettsiae." *Anat Rec* 208 (3):319-27. doi: 10.1002/ar.1092080302.
- Roan, N. R., and M. N. Starnbach. 2008. "Immune-mediated control of Chlamydia infection." *Cell Microbiol* 10 (1):9-19. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01069.x.
- Robbins, P. D., and A. E. Morelli. 2014. "Regulation of immune responses by extracellular vesicles." *Nat Rev Immunol* 14 (3):195-208. doi: 10.1038/nri3622.
- Robertson, M. J. 2002. "Role of chemokines in the biology of natural killer cells." *J Leukoc Biol* 71 (2):173-83.
- Rock, K. L. 2006. "Exiting the outside world for cross-presentation." *Immunity* 25 (4):523-5. doi: 10.1016/j.immuni.2006.09.003.
- Rock, K. L., D. J. Farfan-Arribas, and L. Shen. 2010. "Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation." *J Immunol* 184 (1):9-15. doi: 10.4049/jimmunol.0903399.
- Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg. 1994. "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." *Cell* 78 (5):761-71.
- Rock, K. L., and L. Shen. 2005. "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance." *Immunol Rev* 207:166-83. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x.

- Rockey, D. D., E. R. Fischer, and T. Hackstadt. 1996. "Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittaci* inclusion by use of fluorescence and electron microscopy." *Infect Immun* 64 (10):4269-78.
- Rohde, G., E. Straube, A. Essig, P. Reinhold, and K. Sachse. 2010. "Chlamydial zoonoses." *Dtsch Arztebl Int* 107 (10):174-80. doi: 10.3238/arztebl.2010.0174.
- Romao, S., M. Gannage, and C. Munz. 2013. "Checking the garbage bin for problems in the house, or how autophagy assists in antigen presentation to the immune system." *Semin Cancer Biol* 23 (5):391-6. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.03.001.
- Rottenberg, M. E., A. C. Gigliotti Rothfuchs, D. Gigliotti, C. Svanholm, L. Bandholtz, and H. Wigzell. 1999. "Role of innate and adaptive immunity in the outcome of primary infection with *Chlamydia pneumoniae*, as analyzed in genetically modified mice." *J Immunol* 162 (5):2829-36.
- Rufer, E., R. M. Leonhardt, and M. R. Knittler. 2007. "Molecular architecture of the TAP-associated MHC class I peptide-loading complex." *J Immunol* 179 (9):5717-27.
- Rupp, J., T. Hellwig-Burgel, V. Wobbe, U. Seitzer, E. Brandt, and M. Maass. 2005. "Chlamydia pneumoniae infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (9):3447-52. doi: 10.1073/pnas.0407759102.
- Russell, R. C., Y. Tian, H. Yuan, H. W. Park, Y. Y. Chang, J. Kim, H. Kim, T. P. Neufeld, A. Dillin, and K. L. Guan. 2013. "ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase." *Nat Cell Biol* 15 (7):741-50. doi: 10.1038/ncb2757.
- Russell, S. 2018. "Chlamydia Infection-derived Exosomes Possess Immunomodulatory Properties Capable of Stimulating Dendritic Cell Maturation." *Journal of Advances in Medicine and Medical Research* 25 (1):1-15.
- Sachse, K., K. Laroucau, K. Riege, S. Wehner, M. Dilcher, H. H. Creasy, M. Weidmann, G. Myers, F. Vorimore, N. Vicari, S. Magnino, E. Liebler-Tenorio, A. Ruettger, P. M. Bavoil, F. T. Hufert, R. Rossello-Mora, and M. Marz. 2014. "Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov." *Syst Appl Microbiol* 37 (2):79-88. doi: 10.1016/j.syapm.2013.12.004.
- Saeki, H., A. M. Moore, M. J. Brown, and S. T. Hwang. 1999. "Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes." *J Immunol* 162 (5):2472-5.
- Saka, H. A., J. W. Thompson, Y. S. Chen, Y. Kumar, L. G. Dubois, M. A. Moseley, and R. H. Valdivia. 2011. "Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms." *Mol Microbiol* 82 (5):1185-203. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07877.x.
- Saka, H. A., and R. H. Valdivia. 2010. "Acquisition of nutrients by Chlamydiae: unique challenges of living in an intracellular compartment." *Curr Opin Microbiol* 13 (1):4-10. doi: 10.1016/j.mib.2009.11.002.
- San-Millan, I., and G. A. Brooks. 2017. "Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect." *Carcinogenesis* 38 (2):119-133. doi: 10.1093/carcin/bgw127.
- Sands, J., D. Auperin, and W. Snipes. 1979. "Extreme sensitivity of enveloped viruses, including herpes simplex, to long-chain unsaturated monoglycerides and alcohols." *Antimicrob Agents Chemother* 15 (1):67-73.
- Satpathy, A. T., X. Wu, J. C. Albring, and K. M. Murphy. 2012. "Re(de)fining the dendritic cell lineage." *Nat Immunol* 13 (12):1145-54. doi: 10.1038/ni.2467.
- Sauerwein, H. 2012. "Antichlamydiale Wirkung mehrfach ungesättigter Fettsäuren." *Forschungsbericht Nr. 168, Universität Bonn*.

- Saunderson, S. C., P. C. Schuberth, A. C. Dunn, L. Miller, B. D. Hock, P. A. MacKay, N. Koch, R. W. Jack, and A. D. McLellan. 2008. "Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor." *J Immunol* 180 (12):8146-52.
- Schmid, D., M. Pyaert, and C. Munz. 2007. "Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes." *Immunity* 26 (1):79-92. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.018.
- Schoggins, J. W., and C. M. Rice. 2011. "Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions." *Curr Opin Virol* 1 (6):519-25. doi: 10.1016/j.coviro.2011.10.008.
- Schorey, J. S., Y. Cheng, P. P. Singh, and V. L. Smith. 2015. "Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions." *EMBO Rep* 16 (1):24-43. doi: 10.15252/embr.201439363.
- Schwab, A., S. S. Meyering, B. Lepene, S. Iordanskiy, M. L. van Hoek, R. M. Hakami, and F. Kashanchi. 2015. "Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis." *Front Microbiol* 6:1132. doi: 10.3389/fmicb.2015.01132.
- Scidmore, M. A. 2011. "Recent advances in Chlamydia subversion of host cytoskeletal and membrane trafficking pathways." *Microbes Infect* 13 (6):527-35. doi: 10.1016/j.micinf.2011.02.001.
- Scidmore, M. A., D. D. Rockey, E. R. Fischer, R. A. Heinzen, and T. Hackstadt. 1996. "Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry." *Infect Immun* 64 (12):5366-72.
- Segura, E., S. Amigorena, and C. Thery. 2005. "Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses." *Blood Cells Mol Dis* 35 (2):89-93. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.05.003.
- Seidel, U. J., P. Schlegel, and P. Lang. 2013. "Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies." *Front Immunol* 4:76. doi: 10.3389/fimmu.2013.00076.
- Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer. 2003. "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection." *Immunity* 19 (1):59-70.
- Sharma, M., and T. Rudel. 2009. "Apoptosis resistance in Chlamydia-infected cells: a fate worse than death?" *FEMS Immunol Med Microbiol* 55 (2):154-61. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00515.x.
- Shemer-Avni, Y. 1989. "Reversion of the antichlamydial effect of tumor necrosis factor (TNF) by tryptophan and antibodies to interferon beta." *Infect Immun* 57:3484-3490.
- Shemer, Y. 1987. "Tryptophan reversal of recombinant human gamma-interferon inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth." *Curr. Microbiol.* 16:9-13.
- Shemer, Y., and I. Sarov. 1985. "Inhibition of growth of Chlamydia trachomatis by human gamma interferon." *Infect Immun* 48 (2):592-6.
- Shen, L., L. J. Sigal, M. Boes, and K. L. Rock. 2004. "Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo." *Immunity* 21 (2):155-65. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.004.
- Sheu, C. W., W. N. Konings, and E. Freese. 1972. "Effects of acetate and other short-chain fatty acids on sugar and amino acid uptake of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 111 (2):525-30.
- Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, and M. Mann. 2006. "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." *Nat Protoc* 1 (6):2856-60. doi: 10.1038/nprot.2006.468.
- Shimoda, A., K. Ueda, S. Nishiumi, N. Murata-Kamiya, S. A. Mukai, S. Sawada, T. Azuma, M. Hatakeyama, and K. Akiyoshi. 2016. "Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA." *Sci Rep* 6:18346. doi: 10.1038/srep18346.
- Shresta, S., C. T. Pham, D. A. Thomas, T. A. Graubert, and T. J. Ley. 1998. "How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?" *Curr Opin Immunol* 10 (5):581-7.
- Simhadri, V. R., K. S. Reiners, H. P. Hansen, D. Topolar, V. L. Simhadri, K. Nohroudi, T. A. Kufer, A. Engert, and E. Pogge von Strandmann. 2008. "Dendritic cells release HLA-B-associated

- transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function." *PLoS One* 3 (10):e3377. doi: 10.1371/journal.pone.0003377.
- Simons, M., and G. Raposo. 2009. "Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication." *Curr Opin Cell Biol* 21 (4):575-81. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.007.
- Snapper, C. M., T. M. McIntyre, R. Mandler, L. M. Pecanha, F. D. Finkelman, A. Lees, and J. J. Mond. 1992. "Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens." *J Exp Med* 175 (5):1367-71.
- Snapper, C. M., and W. E. Paul. 1987. "Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production." *Science* 236 (4804):944-7.
- Starnbach, M. N., W. P. Loomis, P. Ovendale, D. Regan, B. Hess, M. R. Alderson, and S. P. Fling. 2003. "An inclusion membrane protein from *Chlamydia trachomatis* enters the MHC class I pathway and stimulates a CD8+ T cell response." *J Immunol* 171 (9):4742-9.
- Steinman, R. M. 1991. "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." *Annu Rev Immunol* 9:271-96. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415.
- Stenner-Liewen, F., H. Liewen, J. M. Zapata, K. Pawlowski, A. Godzik, and J. C. Reed. 2002. "CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors." *J Biol Chem* 277 (12):9633-6. doi: 10.1074/jbc.C100693200.
- Stephens, R. S., S. Kalman, C. Lammel, J. Fan, R. Marathe, L. Aravind, W. Mitchell, L. Olinger, R. L. Tatusov, Q. Zhao, E. V. Koonin, and R. W. Davis. 1998. "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*." *Science* 282 (5389):754-9.
- Stout, R. D., and K. Bottomly. 1989. "Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages." *J Immunol* 142 (3):760-5.
- Strainic, M. G., J. Liu, D. Huang, F. An, P. N. Lalli, N. Muqim, V. S. Shapiro, G. R. Dubyak, P. S. Heeger, and M. E. Medof. 2008. "Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells." *Immunity* 28 (3):425-35. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.001.
- Su, H., L. Raymond, D. D. Rockey, E. Fischer, T. Hackstadt, and H. D. Caldwell. 1996. "A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (20):11143-8.
- Sun, Q., W. Zhong, W. Zhang, and Z. Zhou. 2016. "Defect of mitochondrial respiratory chain is a mechanism of ROS overproduction in a rat model of alcoholic liver disease: role of zinc deficiency." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310 (3):G205-14. doi: 10.1152/ajpgi.00270.2015.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." *Cell* 100 (6):655-69.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." *Annu Rev Immunol* 21:713-58. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942.
- Szaszak, M., P. Steven, K. Shima, R. Orzekowsky-Schroder, G. Huttmann, I. R. Konig, W. Solbach, and J. Rupp. 2011. "Fluorescence lifetime imaging unravels *C. trachomatis* metabolism and its crosstalk with the host cell." *PLoS Pathog* 7 (7):e1002108. doi: 10.1371/journal.ppat.1002108.
- Szklarczyk, D., J. H. Morris, H. Cook, M. Kuhn, S. Wyder, M. Simonovic, A. Santos, N. T. Doncheva, A. Roth, P. Bork, L. J. Jensen, and C. von Mering. 2017. "The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible." *Nucleic Acids Res* 45 (D1):D362-D368. doi: 10.1093/nar/gkw937.
- Szymanska-Czerwinska, M., and K. Niemczuk. 2016. "Avian Chlamydiosis Zoonotic Disease." *Vector Borne Zoonotic Dis* 16 (1):1-3. doi: 10.1089/vbz.2015.1839.
- Tartaglia, L. A., and D. V. Goeddel. 1992. "Two TNF receptors." *Immunol Today* 13 (5):151-3. doi: 10.1016/0167-5699(92)90116-O.

- Taxman, D. J., E. A. Holley-Guthrie, M. T. Huang, C. B. Moore, D. T. Bergstralh, I. C. Allen, Y. Lei, D. Gris, and J. P. Ting. 2011. "The NLR adaptor ASC/PYCARD regulates DUSP10, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and chemokine induction independent of the inflammasome." *J Biol Chem* 286 (22):19605-16. doi: 10.1074/jbc.M111.221077.
- Tey, S. K., and R. Khanna. 2012. "Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway." *Blood* 120 (5):994-1004. doi: 10.1182/blood-2012-01-402404.
- The UniProt, Consortium. 2017. "UniProt: the universal protein knowledgebase." *Nucleic Acids Res* 45 (D1):D158-D169. doi: 10.1093/nar/gkw1099.
- Thery, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz, and S. Amigorena. 2002. "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." *Nat Immunol* 3 (12):1156-62. doi: 10.1038/ni854.
- Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura. 2009. "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." *Nat Rev Immunol* 9 (8):581-93. doi: 10.1038/nri2567.
- Tjaden, J., H. H. Winkler, C. Schwoppe, M. Van Der Laan, T. Mohlmann, and H. E. Neuhaus. 1999. "Two nucleotide transport proteins in Chlamydia trachomatis, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy." *J Bacteriol* 181 (4):1196-202.
- Tomlinson, S. 1993. "Complement defense mechanisms." *Curr Opin Immunol* 5 (1):83-9.
- Topham, N. J., and E. W. Hewitt. 2009. "Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?" *Immunology* 128 (1):7-15. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x.
- Trapani, J. A., and M. J. Smyth. 2002. "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." *Nat Rev Immunol* 2 (10):735-47. doi: 10.1038/nri911.
- Travassos, L. H., L. A. Carneiro, M. Ramjeet, S. Hussey, Y. G. Kim, J. G. Magalhaes, L. Yuan, F. Soares, E. Chea, L. Le Bourhis, I. G. Boneca, A. Allaoui, N. L. Jones, G. Nunez, S. E. Girardin, and D. J. Philpott. 2010. "Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry." *Nat Immunol* 11 (1):55-62. doi: 10.1038/ni.1823.
- Tseng, C. T., and R. G. Rank. 1998. "Role of NK cells in early host response to chlamydial genital infection." *Infect Immun* 66 (12):5867-75.
- Turvey, S. E., and D. H. Broide. 2010. "Innate immunity." *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2):S24-32. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.016.
- Uebel, S., and R. Tampe. 1999. "Specificity of the proteasome and the TAP transporter." *Curr Opin Immunol* 11 (2):203-8.
- Uhl, M., O. Kepp, H. Jusforgues-Saklani, J. M. Vicencio, G. Kroemer, and M. L. Albert. 2009. "Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells." *Cell Death Differ* 16 (7):991-1005. doi: 10.1038/cdd.2009.8.
- Utsugi-Kobukai, S., H. Fujimaki, C. Hotta, M. Nakazawa, and M. Minami. 2003. "MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells." *Immunol Lett* 89 (2-3):125-31.
- Van Lent, S., J. R. Piet, D. Beeckman, A. van der Ende, F. Van Nieuwerburgh, P. Bavoil, G. Myers, D. Vanrompay, and Y. Pannekoek. 2012. "Full genome sequences of all nine Chlamydia psittaci genotype reference strains." *J Bacteriol* 194 (24):6930-1. doi: 10.1128/JB.01828-12.
- van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo. 2018. "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles." *Nat Rev Mol Cell Biol* 19 (4):213-228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- van Niel, G., G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman. 2001. "Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles." *Gastroenterology* 121 (2):337-49.
- Vanrompay, D., R. Ducatelle, F. Haesebrouck, and W. Hendrickx. 1993. "Primary pathogenicity of an European isolate of Chlamydia psittaci from turkey poults." *Vet Microbiol* 38 (1-2):103-13.
- Vasilevsky, S., G. Greub, D. Nardelli-Haeffliger, and D. Baud. 2014. "Genital Chlamydia trachomatis: understanding the roles of innate and adaptive immunity in vaccine research." *Clin Microbiol Rev* 27 (2):346-70. doi: 10.1128/CMR.00105-13.

- Venkatasubramanian, S., S. Cheekatla, P. Paidipally, D. Tripathi, E. Welch, A. R. Tvinnereim, R. Nurieva, and R. Vankayalapati. 2017. "IL-21-dependent expansion of memory-like NK cells enhances protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis*." *Mucosal Immunol* 10 (4):1031-1042. doi: 10.1038/mi.2016.105.
- Viaud, S., M. Terme, C. Flament, J. Taieb, F. Andre, S. Novault, B. Escudier, C. Robert, S. Caillat-Zucman, T. Tursz, L. Zitvogel, and N. Chaput. 2009. "Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15R α ." *PLoS One* 4 (3):e4942. doi: 10.1371/journal.pone.0004942.
- Vielma, S., G. Virella, A. Gorod, and M. Lopes-Virella. 2002. "Chlamydia pneumoniae infection of human aortic endothelial cells induces the expression of FC gamma receptor II (FcgammaRII)." *Clin Immunol* 104 (3):265-73.
- Vignola, M. J., D. F. Kashatus, G. A. Taylor, C. M. Counter, and R. H. Valdivia. 2010. "cPLA2 regulates the expression of type I interferons and intracellular immunity to *Chlamydia trachomatis*." *J Biol Chem* 285 (28):21625-35. doi: 10.1074/jbc.M110.103010.
- Vives-Bauza, C., C. Zhou, Y. Huang, M. Cui, R. L. de Vries, J. Kim, J. May, M. A. Tocilescu, W. Liu, H. S. Ko, J. Magrane, D. J. Moore, V. L. Dawson, R. Grailhe, T. M. Dawson, C. Li, K. Tieu, and S. Przedborski. 2010. "PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (1):378-83. doi: 10.1073/pnas.0911187107.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. "Functions of natural killer cells." *Nat Immunol* 9 (5):503-10. doi: 10.1038/ni1582.
- Vizler, C., T. Nagy, E. Kusz, H. Glavinas, and E. Duda. 2002. "Flow cytometric cytotoxicity assay for measuring mammalian and avian NK cell activity." *Cytometry* 47 (3):158-62.
- Vromman, F., S. Perrinet, L. Gehre, and A. Subtil. 2016. "The DUF582 Proteins of *Chlamydia trachomatis* Bind to Components of the ESCRT Machinery, Which Is Dispensable for Bacterial Growth In vitro." *Front Cell Infect Microbiol* 6:123. doi: 10.3389/fcimb.2016.00123.
- Walch, M., F. Dotiwala, S. Mulik, J. Thiery, T. Kirchhausen, C. Clayberger, A. M. Krensky, D. Martinvalet, and J. Lieberman. 2015. "Cytotoxic Cells Kill Intracellular Bacteria through Granulysin-Mediated Delivery of Granzymes." *Cell* 161 (5):1229. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.021.
- Wang, J., Y. Yao, J. Wu, and G. Li. 2015. "Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods." *Int J Clin Exp Pathol* 8 (6):6135-42.
- Warburg, O. 1956. "On the origin of cancer cells." *Science* 123 (3191):309-14.
- Warren, H. S., and M. J. Smyth. 1999. "NK cells and apoptosis." *Immunol Cell Biol* 77 (1):64-75. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00790.x.
- Waterman, W. H., T. F. Molski, C. K. Huang, J. L. Adams, and R. I. Sha'afi. 1996. "Tumour necrosis factor- α -induced phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 are abrogated by an inhibitor of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils." *Biochem J* 319 (Pt 1):17-20.
- Watts, C. 2001. "Antigen processing in the endocytic compartment." *Curr Opin Immunol* 13 (1):26-31.
- Watzl, C., D. Urlaub, F. Fasbender, and M. Claus. 2014. "Natural killer cell regulation - beyond the receptors." *F1000Prime Rep* 6:87. doi: 10.12703/P6-87.
- Wei, Y., D. Wang, F. Jin, Z. Bian, L. Li, H. Liang, M. Li, L. Shi, C. Pan, D. Zhu, X. Chen, G. Hu, Y. Liu, C. Y. Zhang, and K. Zen. 2017. "Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23." *Nat Commun* 8:14041. doi: 10.1038/ncomms14041.
- Werfel, T., K. Kirchhoff, M. Wittmann, G. Begemann, A. Kapp, F. Heidenreich, O. Gotze, and J. Zwirner. 2000. "Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor." *J Immunol* 165 (11):6599-605.
- Williams, A. P., C. A. Peh, A. W. Purcell, J. McCluskey, and T. Elliott. 2002. "Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin." *Immunity* 16 (4):509-20.

- Williams, D. M., D. M. Magee, L. F. Bonewald, J. G. Smith, C. A. Bleicker, G. I. Byrne, and J. Schachter. 1990. "A role in vivo for tumor necrosis factor alpha in host defense against *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* 58 (6):1572-6.
- Winkler, H. H., and H. E. Neuhaus. 1999. "Non-mitochondrial ATP transport." *Trends Biochem Sci* 24 (2):64-8.
- Wisniewski, J. R., A. Zougman, N. Nagaraj, and M. Mann. 2009. "Universal sample preparation method for proteome analysis." *Nat Methods* 6 (5):359-62. doi: 10.1038/nmeth.1322.
- Wizel, B., J. Nystrom-Asklin, C. Cortes, and A. Tvinnereim. 2008. "Role of CD8(+)T cells in the host response to *Chlamydia*." *Microbes Infect* 10 (14-15):1420-30. doi: 10.1016/j.micinf.2008.08.006.
- Wyatt, J. I., and B. J. Rathbone. 1988. "Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*." *Scand J Gastroenterol Suppl* 142:44-9.
- Xu, J., A. K. Chakrabarti, J. L. Tan, L. Ge, A. Gambotto, and N. L. Vujanovic. 2007. "Essential role of the TNF-TNFR2 cognate interaction in mouse dendritic cell-natural killer cell crosstalk." *Blood* 109 (8):3333-41. doi: 10.1182/blood-2006-06-026385.
- Yamaguchi, H., S. Haranaga, R. Widen, H. Friedman, and Y. Yamamoto. 2002. "*Chlamydia pneumoniae* infection induces differentiation of monocytes into macrophages." *Infect Immun* 70 (5):2392-8.
- Yang, Z., and D. J. Klionsky. 2010. "Eaten alive: a history of macroautophagy." *Nat Cell Biol* 12 (9):814-22. doi: 10.1038/ncb0910-814.
- Yao, T. P. 2010. "The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing." *Genes Cancer* 1 (7):779-786. doi: 10.1177/1947601910383277.
- Ying, S., M. Pettengill, E. R. Latham, A. Walch, D. M. Ojcius, and G. Hacker. 2008. "Premature apoptosis of *Chlamydia*-infected cells disrupts chlamydial development." *J Infect Dis* 198 (10):1536-44. doi: 10.1086/592755.
- Ying, S., M. Pettengill, D. M. Ojcius, and G. Hacker. 2007. "Host-Cell Survival and Death During *Chlamydia* Infection." *Curr Immunol Rev* 3 (1):31-40. doi: 10.2174/157339507779802179.
- Yu, J., Z. Ma, S. Shetty, M. Ma, and J. Fu. 2016. "Selective HDAC6 inhibition prevents TNF-alpha-induced lung endothelial cell barrier disruption and endotoxin-induced pulmonary edema." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311 (1):L39-47. doi: 10.1152/ajplung.00051.2016.
- Zheng, J. 2012. "Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review)." *Oncol Lett* 4 (6):1151-1157. doi: 10.3892/ol.2012.928.
- Zhong, G. M., and L. M. de la Maza. 1988. "Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro or in vivo by recombinant murine gamma interferon inhibits the growth of *Chlamydia trachomatis* serovar L1." *Infect Immun* 56 (12):3322-5.
- Zhu, D., Y. Lai, P. B. Shelat, C. Hu, G. Y. Sun, and J. C. Lee. 2006. "Phospholipases A2 mediate amyloid-beta peptide-induced mitochondrial dysfunction." *J Neurosci* 26 (43):11111-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3505-06.2006.
- Zhu, J., H. Yamane, and W. E. Paul. 2010. "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." *Annu Rev Immunol* 28:445-89. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
- Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena. 1998. "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." *Nat Med* 4 (5):594-600.
- Zocevic, A., F. Vorimore, C. Marhold, D. Horvatek, D. Wang, B. Slavec, Z. Prentza, G. Stavianis, E. Prukner-Radovic, A. Dovc, V. I. Siarkou, and K. Laroucau. 2012. "Molecular characterization of atypical *Chlamydia* and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR." *Environ Microbiol* 14 (8):2212-22. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02800.x.
- Zorov, D. B., M. Juhaszova, and S. J. Sollott. 2014. "Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release." *Physiol Rev* 94 (3):909-50. doi: 10.1152/physrev.00026.2013.
- Zwirner, N. W., and C. I. Domaica. 2010. "Cytokine regulation of natural killer cell effector functions." *Biofactors* 36 (4):274-88. doi: 10.1002/biof.107.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Biphasischer Entwicklungszyklus von Chlamydien (modifiziert nach Brunham <i>et al.</i> , 2005).	13
Abb. 1-2 Schematische Darstellung der verschiedenen Kreuzpräsentationswege.....	22
Abb. 1-3 Genereller Mechanismus der Autophagie (Radomski, Rebbig, et al. 2017).....	30
Abb. 3-1 Mikroskopische Darstellung isolierter Primärzellen und überlagerte <i>Dot-Blot</i> -Analysen von Kontroll- und NK1.1-Anfärbungen zur Bestimmung der Reinheit primärer NK-Zellen.....	52
Abb. 4-1 siRNA-vermittelter <i>Knockdown</i> von cPLA2 in infizierten und nicht-infizierten DCs.....	75
Abb. 4-2 Beteiligung von cPLA2 an der Auflösung der PV in DCs.....	76
Abb. 4-3 Einfluss des cPLA2- <i>Knockdowns</i> auf die Infektion.....	77
Abb. 4-4 Einfluss des cPLA- <i>Knockdowns</i> auf die Infektiosität der Chlamydien.....	78
Abb. 4-5 Einfluss des cPLA2- <i>Knockdowns</i> auf die Autophagie infizierter DCs.....	79
Abb. 4-6 T-Zellaktivierung nach cPLA2- <i>Knockdown</i>	80
Abb. 4-7 Effekt von Arachidonsäure.....	82
Abb. 4-8 Assoziation von Chlamydien mit Mitochondrien in DCs.....	84
Abb. 4-9 Verlust funktionaler Mitochondrien während der Infektion von DCs.....	85
Abb. 4-10 Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials wird kontrolliert durch den TNF- α /cPLA2/AA-Signalweg.....	87
Abb. 4-11 Degradation geschädigter Mitochondrien mittels Mitophagie.....	89
Abb. 4-12 Metabolische Umprogrammierung von DCs während der Infektion.....	90
Abb. 4-13 Lokalisation von acetyliertem α -Tubulin während der Infektion.....	92
Abb. 4-14 Expression von acetyliertem α -Tubulin und HDAC6.....	93
Abb. 4-15 Inhibition von HDAC6 führt zu einem Epithelzell-ähnlichen Phänotyp.....	95
Abb. 4-16 Erhöhte Vimentinexpression und -aggregation während der Infektion.....	97
Abb. 4-17 Aggresomenbildung in infizierten DCs.....	98
Abb. 4-18 Assoziation von Aggregaten mit Aggrephagie-/Mitophagieproteinen.....	99
Abb. 4-19 Identifizierung aggresomaler Proteine.....	101
Abb. 4-20 Assoziation von Chlamydien mit Mitophagie-assoziierten Proteinen.....	103
Abb. 4-21 Einfluss der <i>Knockdowns</i> Aggrephagie-assoziiierter Proteine auf die Autophagie.....	105
Abb. 4-22 LC-3-Assoziation von Chlamydien in KD-Zellen.....	107
Abb. 4-23 Auswirkung der KD auf die Infektion und T-Zellaktivierung.....	109
Abb. 4-24 Autophagie in infizierten BMDCs.....	111
Abb. 4-25 Autophagie in infizierten humanen DCs.....	114
Abb. 4-26 Isolation von Exosomen aus infizierten DCs.....	118
Abb. 4-27 Identifizierung exosomaler Proteine infizierter DCs.....	119
Abb. 4-28 Infektiosität von Dexosomen.....	121
Abb. 4-29 CD95-vermittelte Apoptose durch iDexosomen.....	123
Abb. 4-30 Induktion der IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen durch iDexosomen.....	125
Abb. 4-31 Synergistischer Effekt von IFN- γ auf die TNF- α -induzierte Apoptose.....	126
Abb. 4-32 Einfluss der erhöhten IFN- γ -Sekretion auf die Apoptose in Epithelzellen.....	128
Abb. 4-33 Infektion von NK-Zellen.....	131
Abb. 4-34 Infektion von primären NK-Zellen.....	133
Abb. 4-35 Aktivierung von NK-Zellen während der Infektion.....	134
Abb. 4-36 Einfluss verschiedener Exozytoseinhibitoren auf die Infektion.....	136

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4-37 Assoziation chlamydialer Strukturen mit COPI-Vesikeln	137
Abb. 4-38 Assoziation von chlamydialen Strukturen mit Perforin	138
Abb. 4-39 Assoziation von chlamydialen Strukturen mit Perforin in primären NK-Zellen.....	139
Abb. 4-40 Granzym-B-Sekretion infolge der Stimulation bzw. Infektion	140
Abb. 4-41 TEM-Aufnahmen Chlamydien-infizierter NK-Zellen	142
Abb. 4-42 PKC-Aktivierung nach Stimulation und während der Infektion.....	144
Abb. 4-43 Mehrfache Infektion und Killing-Fähigkeit von NK-Zellen	146
Abb. 4-44 Infektiosität von Chlamydien aus NK-Zellüberständen	148
Abb. 4-45 Einfluss von Granzym-B auf die Infektiosität von Chlamydien	149
Abb. 4-46 MHCI-Expression von DCs nach Behandlung mit Chlamydien aus NK-Zellen.....	150
Abb. 4-47 Testen der Mausseren auf Chlamydien-spezifische Antikörper	153
Abb. 4-48 Charakterisierung der Immunantwort.....	155
Abb. 4-49 Untersuchung der Funktion des Impfsersums	157
Abb. 5-1 Postuliertes Arbeitsmodell zur mito-xenophagosomalen Degradation chlamydialer Strukturen in infizierten DCs	175
Abb. 5-2 Postuliertes Arbeitsmodell zur Rolle von iDexosomen während der Chlamydieninfektion	176
Abb. 5-3 Postuliertes Arbeitsmodell zur anti-chlamydialen Abwehr von NK-Zellen und der durch die freigesetzte „Eigenvakzine“ ausgelösten Immunantwort.....	177

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Chlamydiale Systematik und Wirtspräferenz	11
Tab. 2.1 Verwendete Chlamydienstämme	36
Tab. 2.2 Verwendete Zelllinien.....	36
Tab. 2.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	36
Tab. 2.4 Verwendete Medien und Medienzusätze	38
Tab. 2.5 Verwendete Primärantikörper	38
Tab. 2.6 Verwendete Sekundärantikörper	39
Tab. 2.7 Verwendete Inhibitoren	40
Tab. 2.8 Verwendete Primersequenzen	40
Tab. 2.9 Verwendete siRNA-Sequenzen.....	41
Tab. 2.10 Verwendete Kits	41
Tab. 2.11 Verwendete Glaswaren	42
Tab. 2.12 Verwendete Plastikwaren	42
Tab. 2.13 Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	42
Tab. 2.14 Verwendete Geräte	43
Tab. 2.15 Verwendete Software.....	44
Tab. 3.1 Eingesetzte Zellkulturmedien	45
Tab. 3.2 Eingesetzte EDTA-Trypsin-Lösungen	46
Tab. 3.3 Verwendete Einfriermedien	47
Tab. 3.4 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes	47
Tab. 3.5 PCR-Temperaturprofil.....	48
Tab. 3.6 Zusammensetzung eines 1%-igen Agarosegels	48
Tab. 3.7 Zusammensetzung des SPGA-Puffers.....	49
Tab. 3.8 eingesetzte MOI für die Infektion der verschiedenen Zelllinien	50
Tab. 3.9 Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz	53
Tab. 3.10 Verwendete Puffer und Lösungen für die TEM	54
Tab. 3.11 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	56
Tab. 3.12 Puffer für die Herstellung von Zelllysaten	60
Tab. 3.13 Zusammensetzung des Acrylamidgels.....	60
Tab. 3.14 eingesetzte Puffer für die SDS-PAGE	61
Tab. 3.15 verwendete Lösungen für die Western-Blot-Analyse	62
Tab. 3.16 Zusammensetzung des Ripa-Puffers für die Exosomenanalyse	63
Tab. 3.17 Verwendete Puffer für die Aggresomenisolation.....	63
Tab. 3.18 Ansatz für die Reverse Transkription-Reaktion	69
Tab. 3.19 Temperaturprofil der Reversen Transkription	69
Tab. 3.20 Ansatz für die semiquantitative PCR	70
Tab. 3.21 Temperaturprofil der semiquantitativen PCR	70
Tab. 3.22 verwendete Transfektionslösung	71
Tab. 3.23 Zusammensetzung des Co-Kultivierungs-Mediums	73
Tab. 4.1 Ausgewählte exosomale Markerproteine	120

Anhang

Identifizierte Proteine in iDexosomen

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
P17426-2	Isoform B of AP-2 complex subunit alpha-1	105,4	2	71,5
Q76MZ3	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	65,3	5	71,5
Q6P9J9	Anoctamin-	106,2	3	64,5
Q9Z2X1-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	43,7	1	63,7
Q8VDM4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	100,1	4	63,6
P83626	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 26	22,7	2	62
Q9WV91	Prostaglandin F2 receptor negative regulator	98,7	2	61,3
Q3TXS7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	105,7	3	60,4
S4R1E5	Glutathione peroxidase	17,9	1	57,7
Q61549	Adhesion G protein-coupled receptor E1	102,1	4	57,1
H3BL49	T-complex protein 1 subunit theta	53	5	57
Q3U1Z5-2	Isoform 2 of G-protein-signaling modulator 3	13,5	1	56,3
P63260	Actin, cytoplasmic 2	41,8	49	51,6
A0A0A0MQF6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	38,6	21	51,2
Q05816	Fatty acid-binding protein, epidermal	15,1	9	50,5
Q8K1X4	NCK associated protein 1 like	128,8	3	50
P62334	26S protease regulatory subunit 10B	44,1	5	49,6
Q9WTK5	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	96,8	2	48,2
A0A0G2JGC1	Serine/threonine-protein phosphatase	31,3	6	47,9
P80313	T-complex protein 1 subunit eta	59,6	8	47,7
P45376	Aldose reductase	35,7	4	47,5
P70168	Importin subunit beta-1	97,1	4	47,1
P01942	Hemoglobin subunit alpha	15,1	3	46,9
P11152	Lipoprotein lipase	53,1	10	46,5
Q8HWB2	Protein H2-Q4	39,6	4	46,2
Q61753	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	56,5	4	45,8
Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	191,4	52	45,7
A0A0A0MQG2	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (Fragment)	244,1	2	45,5
P05213	Tubulin alpha-1B chain	50,1	24	45,4
Q3TWW4	AP-2 complex subunit mu	49,4	3	45
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	42	18	44,5
P32261	Antithrombin-III	52	5	44,3
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	50,1	17	44,2
Q3TH01	H-2 class I histocompatibility antigen, K-K alpha chain	40,3	8	43,7
Q9D0I9	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	75,6	3	43,5
E9PYK3	Poly [ADP-ribose] polymerase	216	1	42,4
P68372	Tubulin beta-4B chain	49,8	34	42,3

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
P11499	Heat shock protein HSP 90-beta	83,2	38	42,3
P97384	Annexin A11	54	12	41,1
P63001	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	21,4	6	41,1
E9QAT6	CAD protein	105,6	2	40,8
P08752	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	40,5	17	40,2
Q9EPL8	Importin-7	119,4	3	40,1
P27601	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	44	8	39,4
Q02053	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	117,7	6	38,8
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	70,8	38	38,2
Q9D1A2	Cytosolic non-specific dipeptidase	52,7	3	37,8
P26043	Radixin	68,5	24	37,7
Q8BG32	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	47,4	3	37,1
Q07797	Galectin-3-binding protein	64,4	25	36,4
P11983	T-complex protein 1 subunit alpha	60,4	7	35,8
P58252	Elongation factor 2	95,3	19	35,1
Q9JKR6	Hypoxia up-regulated protein 1	111,1	2	34,7
Q9CQV8-2	Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha	27,8	9	34,7
Q9WVA4	Transgelin-2	22,4	9	34,4
Q91VI7	Ribonuclease inhibitor	49,8	7	34,3
Q9DB05	Alpha-soluble NSF attachment protein	33,2	3	34,1
O35744	Chitinase-like protein 3	44,4	6	33,9
P28271	Cytoplasmic aconitate hydratase	98,1	5	33,7
Q9DCD0	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	53,2	9	33,5
Q9WUM4	Coronin-1C	53,1	7	33,1
A2AGN7	26S protease regulatory subunit 6A	44,6	3	33,1
Q3TRH2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	48,3	4	32,6
Q8QZY1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	66,6	4	32,2
P40240	CD9 antigen	25,2	5	32
Q64514-2	Isoform Short of Tripeptidyl-peptidase 2	138,4	5	31
P10605	Cathepsin B	37,3	7	30,8
Q3U2C5	E3 ubiquitin-protein ligase RNF149	42,5	4	29,7
P63330	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	35,6	3	29,7
Q60605	Myosin light polypeptide 6	16,9	6	29,6
G3UYZ1	Immunoglobulin superfamily member 8	58,1	2	29,5
E9QNL8	Integrin alpha-L	128,1	6	29,4
H7BWZ3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	19,6	3	29,3
P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	26	11	29,1
P17182	Alpha-enolase	47,1	13	29
A0A0A6YXF6	Transforming protein RhoA (Fragment)	18,7	6	29
P01899	H-2 class I histocompatibility antigen, D-B alpha chain	40,8	9	28,9
Q80VQ0	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	52,3	7	28,2
P26040	Ezrin	69,4	21	28,1
P02535-3	Isoform 3 of Keratin, type I cytoskeletal 10	49,5	3	28

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
P51150	Ras-related protein Rab-7a	23,5	6	27,8
Q9D8N0	Elongation factor 1-gamma	50	12	27,8
E9PZ00	Prosaposin	60,6	2	27,6
Q9CQF9	Prenylcysteine oxidase	56,5	2	27,5
Q99JY9	Actin-related protein 3	47,3	16	27,4
P62702	40S ribosomal protein S4, X isoform	29,6	3	27,4
Q9DC51	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	40,5	10	27,3
Q3V117	ATP-citrate synthase	120,7	18	27,2
P61028	Ras-related protein Rab-8B	23,6	3	27
Q9R0E1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	84,9	5	26,7
Q8K1B8	Fermitin family homolog 3	75,6	8	26,6
P50543	Protein S100-A11	11,1	7	26,5
Q8C253	Galectin	27,4	7	26,3
Q64281-2	Isoform 2 of Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4	33	2	26,1
Q9CZE3	Ras-related protein Rab-32	25,1	2	25,4
Q9QXS1-15	Isoform PLEC-1H of Plectin	506,1	13	25,4
P97370	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	31,8	6	25,3
D3YXG6	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	32,5	4	25,3
P18760	Cofilin-1	18,5	10	25,2
P61982	14-3-3 protein gamma	28,3	8	25,2
Q9CZU6	Citrate synthase, mitochondrial	51,7	2	25,1
E9PWE9	Tyrosine-protein kinase	66	8	25,1
Q69ZN7	Myoferlin	233,2	15	25,1
G3UZD3	Ras-related protein Rab-11B	21,8	8	24,9
Q3UEJ6	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	86,5	2	24,7
P63085	Mitogen-activated protein kinase 1	41,2	4	24,4
Q61093	Cytochrome b-245 heavy chain	65,3	10	24,4
P63094-2	Isoform Gnas-2 of Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	44,2	5	24,3
P80317	T-complex protein 1 subunit zeta	58	3	24,2
P62880	Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(S)/G(T) subunit beta-2	37,3	9	24,2
J3QP71	Basigin (Fragment)	21,7	2	24,1
P68510	14-3-3 protein eta	28,2	8	24,1
Q8C570	mRNA export factor	40,9	1	24
P55258	Ras-related protein Rab-8A	23,7	3	23,9
Q9JKF1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	188,6	23	23,8
Q3U7R1-2	Isoform 2 of Extended synaptotagmin-1	99,6	1	23,8
P97449	Aminopeptidase N	109,6	18	23,7
Q9QUJ7-2	Isoform Short of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	74,3	7	23,4
G3X8X6	Sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin, isoform CRA_b	183,5	5	23,4
Q9CQI6	Coactosin-like protein	15,9	5	23,3
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	27,8	8	23,1
Q3U1U4	Integrin alpha-M	135,9	15	22,9

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
P21279	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	42,1	8	22,8
Q8CIE6	Coatomer subunit alpha	138,3	6	22,7
Q6P6I8	Signal-regulatory protein alpha	56	3	22,5
B7FAU9	Filamin, alpha	280,3	42	22,5
P35700	Peroxiredoxin-1	22,2	10	22,4
O35678	Monoglyceride lipase	33,4	7	22,3
Q62465	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	43,1	10	22,1
Q00519	Xanthine dehydrogenase/oxidase	146,5	3	22
Q07076	Annexin A7	49,9	12	22
Q9EQP2	EH domain-containing protein 4	61,4	3	21,9
P26638	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	58,4	8	21,8
Q8BGQ7	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	106,8	4	21,8
Q64339	Ubiquitin-like protein ISG15	17,9	2	21,7
P46467	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	49,4	1	21,7
Q3UW83	40S ribosomal protein S10	18,4	1	21,7
D3Z3G6	Mitogen-activated protein kinase	42,4	4	21,5
Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B	17,4	4	21,3
P10852	4F2 cell-surface antigen heavy chain	58,3	5	21,2
P34960	Macrophage metalloelastase	54,9	6	21,2
Q55WU9	Acetyl-CoA carboxylase 1	265,1	7	21
Q99JI4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	45,5	6	20,9
O55131	Septin-7	50,5	4	20,9
E9Q5B5	Hexokinase	99,2	4	20,9
Q5SUA5	Unconventional myosin-Ig	117,2	16	20,8
P26039	Talin-1	269,7	10	20,7
Q9JIW9	Ras-related protein Ral-B	23,3	2	20,7
Q61462-2	Isoform 2 of Cytochrome b-245 light chain	17,6	2	20,6
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,3	17	20,5
Q9WVK4	EH domain-containing protein 1	60,6	16	20,3
P40124	Adenylyl cyclase-associated protein 1	51,5	9	20,3
P80316	T-complex protein 1 subunit epsilon	59,6	5	20,2
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	18	6	20,2
P61226	Ras-related protein Rap-2b	20,5	1	19,8
Q9R1Q7	Proteolipid protein 2	16,6	1	19,6
P31996-2	Isoform Short of Macrosialin	33,8	1	19,6
Q8K297	Procollagen galactosyltransferase 1	71	3	19,1
H3BLJ9	S-formylglutathione hydrolase	28,5	8	18,9
Q9WTR1	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	85,9	6	18,6
D3Z494	MCG142264, isoform CRA_a	32,7	1	18,5
P49722	Proteasome subunit alpha type-2	25,9	2	18,4
P58242	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b	51,6	9	18,3
P15379-2	Isoform 13 of CD44 antigen	40	5	18,2

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
Q9Z0L8-2	Isoform II of Gamma-glutamyl hydrolase	35,4	1	18,1
P50446	Keratin, type II cytoskeletal 6A	59,3	3	17,8
Q61792	LIM and SH3 domain protein 1	30	3	17,7
Q9DCH4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	38	1	17,7
O70310	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	56,9	1	17,6
Q6NXH9	Keratin, type II cytoskeletal 73	58,9	2	17,5
D3YV43	40S ribosomal protein S3	21	1	17,3
V9GX81	Protein Mroh6	78,4	1	17,2
P17751	Triosephosphate isomerase	32,2	6	17,1
Q8BGU5-2	Isoform 2 of Cyclin-Y	36,5	1	17,1
Q9DB34	Charged multivesicular body protein 2a	25,1	1	16,9
P49446-3	Isoform 3 of Receptor-type tyrosine-protein phosphatase epsilon	71,4	2	16,9
A2AQB2	Protein Neb	352,9	1	16,9
Q06138	Calcium-binding protein 39	39,8	2	16,8
P26041	Moesin	67,7	57	16,8
P60710	Actin, cytoplasmic 1	41,7	48	16,5
Q8VDD5	Myosin-9	226,2	44	16,3
P99024	Tubulin beta-5 chain	49,6	39	16,3
P97429	Annexin A4	35,9	29	16,1
P07356	Annexin A2	38,7	28	15,9
P19096	Fatty acid synthase	272,3	36	15,9
P52480	Pyruvate kinase PKM	57,8	26	15,5
P68033	Actin, alpha cardiac muscle 1	42	29	15,5
P52480-2	Isoform M1 of Pyruvate kinase PKM	57,9	23	15,4
P68369	Tubulin alpha-1A chain	50,1	21	15,4
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	112,9	19	15,3
P10107	Annexin A1	38,7	17	15,3
Q9JHU4	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	531,7	27	15,3
A0A0A6YWC8	Vimentin	49,2	23	15,2
P21956-2	Isoform 2 of Lactadherin	47,1	20	15,1
Q64444	Carbonic anhydrase 4	34,3	15	15,1
Q9EQK5	Major vault protein	95,9	18	14,9
S4R1M0	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	128,5	18	14,6
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	84,7	17	14,6
Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1	27	13	14,5
Q542I8	Integrin beta	84,8	14	14,4
F8WIT2	Annexin	75,2	16	14,4
Q9WU78-3	Isoform 3 of Programmed cell death 6-interacting protein	96,7	13	14,2
P21981	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	77	13	14,1
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	28,8	12	13,7
P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A	68,3	15	13,7
P57780	Alpha-actinin-4	104,9	16	13,6

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
Q61233	Plastin-2	70,1	15	13,4
P40142	Transketolase	67,6	12	13,1
P68040	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	35,1	10	13
Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89,3	12	12,9
P48036	Annexin A5	35,7	12	12,9
Q7TPR4	Alpha-actinin-1	103	14	12,9
P60843	Eukaryotic initiation factor 4A-I	46,1	11	12,9
P80314	T-complex protein 1 subunit beta	57,4	10	12,8
Q00612	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X	59,2	12	12,7
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	44,5	8	12,7
P14685	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	60,7	11	12,6
P14234	Tyrosine-protein kinase Fgr	58,8	9	12,4
P16045	Galectin-1	14,9	6	12,4
A0A0A6YW67	MCG23377, isoform CRA_b	8,7	7	12,4
Q9Z1Q9	Valine--tRNA ligase	140,1	10	12,3
P13597-2	Isoform 2 of Intercellular adhesion molecule 1	58,7	7	12,2
P47757-2	Isoform 2 of F-actin-capping protein subunit beta	30,6	8	12,2
Q3U4W8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	93,3	8	12,1
P62814	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	56,5	10	12,1
P62835	Ras-related protein Rap-1A	21	7	12
P60766	Cell division control protein 42 homolog	21,2	7	12
P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	38,6	7	12
P14206	40S ribosomal protein SA	32,8	7	12
P09055	Integrin beta-1	88,2	10	11,8
P29351-2	Isoform 2 of Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	67,7	8	11,7
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	70,6	5	11,7
H3BKR2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 (Fragment)	30,2	6	11,5
Q99LB4	Capping protein (Actin filament), gelsolin-like	38,7	6	11,4
E9Q616	Protein Ahnak	603,9	9	11,4
O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,2	7	11,4
P16460	Argininosuccinate synthase	46,6	9	11,3
P62962	Profilin-1	14,9	5	11,1
P99029-2	Isoform Cytoplasmic+peroxisomal of Peroxiredoxin-5, mitochondrial	17	5	11,1
P46471	26S protease regulatory subunit 7	48,6	8	11
O88342	WD repeat-containing protein 1	66,4	9	10,8
P80315	T-complex protein 1 subunit delta	58	6	10,8
P62137	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	37,5	8	10,7
Q9QYB1	Chloride intracellular channel protein 4	28,7	8	10,7
P61161	Actin-related protein 2	44,7	6	10,6
P84096	Rho-related GTP-binding protein RhoG	21,3	7	10,5
Q9CZD3	Glycine--tRNA ligase	81,8	6	10,4
P59999	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	19,7	7	10,3

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
Q8R1F1	Niban-like protein 1	84,8	7	10,2
P54775	26S protease regulatory subunit 6B	47,4	7	10,2
P35278	Ras-related protein Rab-5C	23,4	7	10,1
Q9WTI7-4	Isoform 4 of Unconventional myosin-Ic	111,2	7	10,1
Q78PY7	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	102	8	10
E9Q133	T-complex protein 1 subunit gamma	56,5	7	9,9
Q9WUU7	Cathepsin Z	34	4	9,9
Q9EQH3	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	91,7	6	9,9
Q99PT1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	23,4	6	9,8
P62806	Histone H4	11,4	4	9,8
Q8CAG6	Pleckstrin	37,1	5	9,5
Q61598-2	Isoform 2 of Rab GDP dissociation inhibitor beta	46,6	6	9,5
H3BLG5	Syntenin-1 (Fragment)	26,8	3	9,5
P61205	ADP-ribosylation factor 3	20,6	6	9,3
Q9WV32	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	41	6	9,2
P62196	26S protease regulatory subunit 8	45,6	5	9,1
Q6ZWQ9	MCG5400	19,9	5	9,1
P18581-2	Isoform 2 of Cationic amino acid transporter 2	71,7	4	9
P25911-2	Isoform 2 of Tyrosine-protein kinase Lyn	56,2	7	8,9
P14869	60S acidic ribosomal protein P0	34,2	6	8,9
F6Y6L6	Cathepsin D (Fragment)	29,9	4	8,8
P62827	GTP-binding nuclear protein Ran	24,4	6	8,8
P17809	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	53,9	5	8,8
P08207	Protein S100-A10	11,2	3	8,8
Q91V41	Ras-related protein Rab-14	23,9	5	8,8
G3V011	Unconventional myosin-IIf	90,5	6	8,7
P70206	Plexin-A1	211	6	8,7
AEG87057.1	outer membrane porin CP002806.1_prot_CPS0B_0059_48 CPS0B_0059	43,2	5	8,7
P61164	Alpha-centractin	42,6	4	8,7
P62259	14-3-3 protein epsilon	29,2	5	8,7
Q9CY64	Biliverdin reductase A	33,5	3	8,7
D3Z074	Protein diaphanous homolog 1	135,7	6	8,6
Q8JZQ9	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	91,3	6	8,6
S4R2D5	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	68,2	4	8,6
Q6PHN9	Ras-related protein Rab-35	23	2	8,5
A0A0R4J119	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	144,8	7	8,3
P26516	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	36,5	3	8,3
Q6P069-2	Isoform 2 of Sorcin	20,3	3	8,2
P35762	CD81 antigen	25,8	2	8,1
Q8BT60	Copine-3	59,5	5	8
Q921M7	Protein FAM49B	36,8	3	8
P23116	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	161,8	4	8

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,3	4	7,8
F8WIX8	Histone H2A	13,6	3	7,8
P12815-2	Isoform 2 of Programmed cell death protein 6	21,6	4	7,8
P41233	ATP-binding cassette sub-family A member 1	253,7	3	7,7
F6TVP2	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1 (Fragment)	72,8	5	7,7
E9Q7Q3	Tropomyosin alpha-3 chain	28,7	6	7,6
P62204	Calmodulin	16,8	3	7,6
Q8CGC7	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	170	5	7,6
Q99KI0	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,4	5	7,5
P10833	Ras-related protein R-Ras	23,7	4	7,5
F6UKN5	Septin-2 (Fragment)	12,1	3	7,4
P19157	Glutathione S-transferase P 1	23,6	2	7,2
Q9JHF5	V-type proton ATPase subunit a	93,4	5	7,1
Q9R0P5	Dextrin	18,5	3	7,1
Q64343	ATP-binding cassette sub-family G member 1	74	4	7,1
Q9QUN7	Toll-like receptor 2 G	89,4	4	7,1
A0A0G2JF23	Malate dehydrogenase (Fragment)	21	3	7
Q8BFY6	Peflin	29,2	2	7
E9Q5I9	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	39,7	3	7
O35316	Sodium- and chloride-dependent taurine transporter	69,8	3	6,8
O70145	Neutrophil cytosol factor 2	59,4	3	6,8
P35456	Urokinase plasminogen activator surface receptor	35,4	2	6,8
Q3TW96	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1	56,6	4	6,8
H7BX99	Prothrombin	70,2	4	6,7
Q6X893	Choline transporter-like protein 1	73	3	6,7
E9QN37	Macrophage-expressed gene 1 protein	79,1	4	6,6
Q3UJQ9	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	52,2	2	6,6
P21447	Multidrug resistance protein 1A	140,6	3	6,6
Q64324	Syntaxin-binding protein 2	66,3	4	6,6
A3KGK7	Copine-1 (Fragment)	41,9	3	6,6
E9Q3L2	Protein Pi4ka	231,2	3	6,6
H3BK84	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	28,4	2	6,4
O08807	Peroxisomal protein 4 GN=Prdx4 PE=1 SV=1	31	3	6,3
A0A0N4SVM0	F-actin-capping protein subunit alpha-2 (Fragment)	19,5	2	6,3
Q91ZJ5-2	Isoform 2 of UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	55,7	3	6,3
P20491	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	9,6	2	6,2
Q9Z1G3	V-type proton ATPase subunit C 1	43,9	3	6,2
O88543	COP9 signalosome complex subunit 3	47,8	2	6,1
Q8CDN6	Thioredoxin-like protein 1	32,2	3	6,1
P11688	Integrin alpha-5 G	115	2	6,1
Q9QUM9	Proteasome subunit alpha type-6	27,4	2	6
A0A0G2JGP4	GTPase NRas (Fragment)	20,6	2	5,9

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
A8DUK4	Beta-globin	15,7	2	5,9
A0A0N4SVB8	ADP-ribosylation factor-like protein 8B	16	3	5,9
Q05117	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	36,8	2	5,8
Q61316	Heat shock 70 kDa protein 4	94,1	2	5,8
P16546-2	Isoform 2 of Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	282,2	3	5,8
A0A0A0MQM0	Eukaryotic translation initiation factor 5A (Fragment)	16,3	2	5,7
Q8BTY2-2	Isoform 2 of Sodium bicarbonate cotransporter 3	104,6	2	5,6
D3YW57	Coronin (Fragment)	25,2	3	5,6
O88844	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	46,6	3	5,6
G5E850	Cytochrome b-5, isoform CRA_a	11,1	2	5,6
D3YWF6	Ubiquitin thioesterase OTUB1	28	2	5,6
D3Z0B9	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	79,4	3	5,5
Q9D662	Protein transport protein Sec23B	86,4	3	5,4
Q9D8U8	Sorting nexin-5	46,8	3	5,4
D3YX34	Dynactin subunit 1	126,7	3	5,3
F6ZLC6	Histone-binding protein RBBP7 (Fragment)	26,6	1	5,2
A0A0J9YUJ8	Gelsolin (Fragment)	18,7	2	5,1
Q61171	Peroxiredoxin-2	21,8	2	5
AEG87684.1	elongation factor Tu CP002806.1_prot_CPS0B_0751_675 tuf	43,2	2	5
O55135	Eukaryotic translation initiation factor 6 GN=Eif6 PE=1 SV=2	26,5	1	5
A2APV2-2	Isoform 2 of Formin-like protein 2	117,6	2	5
Q91YR1	Twinfilin-1	40,1	3	4,8
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	13,9	3	4,8
Q9CPX4	Ferritin	20,8	2	4,6
V9GX15	C-type lectin domain family 7 member A	22,4	2	4,5
A0A0G2JDJ5	Farnesyl pyrophosphate synthase (Fragment)	13,9	1	4,5
O35598	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	83,9	2	4,4
Q00623	Apolipoprotein A-I	30,6	2	4,4
Q8C0C7	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	57,6	3	4,3
Q62422	Osteoclast-stimulating factor 1	23,8	2	4,3
P54116	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	31,4	1	4,3
Q9ES97-3	Isoform 3 of Reticulon-3	25,4	2	4,3
A0A0G2JE27	F-actin-capping protein subunit alpha-1 (Fragment)	13,1	2	4,2
Q9DCL9	Multifunctional protein ADE2	47	2	4,2
P50247	Adenosylhomocysteinase	47,7	1	4,1
Q8BY89-2	Isoform 2 of Choline transporter-like protein 2	79,9	1	4,1
D3YUA3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type (Fragment)	17,9	2	4
Q61206	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	25,6	1	4
O09131	Glutathione S-transferase omega-1	27,5	2	4
P35979	60S ribosomal protein L12	17,8	1	3,9
P07724	Serum albumin	68,6	1	3,8
P08508	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III	30	2	3,6

Danksagung

Accession	Protein	MW [kDa]	#Peptide	SC [%]
Q9CWI9	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	64,2	2	3,6
P97326	Cadherin-6	88,3	1	3,5
Q9JJU8	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	12,8	1	3,5
Q8BU31	Ras-related protein Rap-2c	20,7	1	3,4
O88587-2	Isoform Soluble of Catechol O-methyltransferase	24,7	2	3,4
A0A0N4SVH4	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Fragment)	10,2	2	3,4
Q8BH78	Reticulon	38,4	2	3,4
Q9D2R0	Acetoacetyl-CoA synthetase	75,2	2	3,2
Q91YS8	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1	41,6	1	3,2
P10810	Monocyte differentiation antigen CD14	39,2	2	3,1
Q80SY3	V-type proton ATPase subunit d 2	40,5	1	3
Q9JIF7	Coatomer subunit beta	107	2	2,9
G3UWR9	Beta-2-microglobulin	19	1	2,9
S4R2A9	Protein transport protein Sec31A (Fragment)	101	2	2,8
Q3U2S8	Voltage-gated hydrogen channel 1	31,2	1	2,7
P52624	Uridine phosphorylase 1	34,1	1	2,7
Q8BH95	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	31,5	1	2,6
H3BJE0	Granulins (Fragment)	27,1	2	2,6
P53996-2	Isoform 2 of Cellular nucleic acid-binding protein	18,7	2	2,6
P55264-2	Isoform Short of Adenosine kinase	38,4	1	2,4
Q9JJ00	Phospholipid scramblase 1	35,9	2	2,4
A0A0R4J1C2	Calpain small subunit 1	22,9	1	2,4
P41241	Tyrosine-protein kinase CSK	50,7	1	2,3
P24668	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	31,2	1	2,3
F7CAT1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment)	20,9	1	2,2
Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	22,1	1	2,2
O88536	Formyl peptide receptor 2	39,4	1	2,1
P68404	Protein kinase C beta type	76,7	1	2
A0A0G2JF60	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (Fragment)	21,5	1	2
P70460	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	39,6	1	2
Q8BP47	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	64,2	1	1,9
Q3V2Y9	Dual-specificity protein phosphatase 3	13,2	1	1,8
Q9QXB9	Developmentally-regulated GTP-binding protein 2	40,7	1	1,7
A0A0G2JFT9	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta (Fragment)	12,7	1	1,6
Q9JL99-2	Isoform 2 of C-type lectin domain family 1 member B	22,9	1	1,6
Q2TBE6	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	54,2	1	1,5
Q62170	P-selectin glycoprotein ligand 1	41,8	1	1,4
G3UX43	Elongation factor 1-beta	7,5	1	1,4
P35831	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12	86,5	1	1,1
AE87980.1	hypothetical protein CP002806.1_prot_CPS0B_1072_971 CPS0B_1072	29,4	1	0,6
G3X9U9	Fission 1 (Mitochondrial outer membrane) homolog (Yeast), isoform CRA_c	16,3	1	0,2